



TITLE:

p120カテニンによるカドヘリンの
機能制御の研究(Dissertation_全文
)

AUTHOR(S):

青野, 真也

CITATION:

青野, 真也. p120カテニンによるカドヘリンの機能制御の研究. 京都大学, 1999, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1999-07-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3156114>

RIGHT:

主論文

学位申請論文

p120カテニンによる
カドヘリンの機能制御の研究

京都大学理学研究科
生物科学専攻

青野真也

論文要旨

カドヘリンはホモフィリック結合型の接着分子で、そのサブタイプに特異的な細胞外領域で規定される選択的な結合は、発生における形態形成の際、重要な役割を担うと考えられている。一方、細胞内領域でカドヘリンは、 α -カテニン、 β -カテニン、p120 など様々な分子と相互作用していることが知られ、これらの分子は、カドヘリンの接着分子としての機能制御に関わっていると考えられている。本研究では上皮型カドヘリン(E-カドヘリン)の接着分子としての活性を制御できる細胞株を発見し、これを用いて新たな制御機構の解明を目指した。

ヒト大腸癌由来の細胞株Colo205はE-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニンを発現しているにもかかわらず、お互いに接着しない。すなわち、カドヘリン/カテニン接着システムが働かない状態にある。ところが、この細胞をプロテインカイネースC(PKC)などの阻害剤であるstaurosporineを加えて数時間培養すると、細胞間接着の誘導が認められた。staurosporineと同時にE-カドヘリンの機能阻害抗体を加えると、この細胞間接着が誘導されないことから、この接着はE-カドヘリン依存性の細胞接着であることが判明した。また、低濃度のトリプシンの存在下で培養した際にも、E-カドヘリン依存性の細胞接着が誘導されることがわかった。

Colo205細胞が以上のような接着特性を示す原因を解明する目的で、引き続いて、これらの接着誘導時にE-カドヘリン、カテニンに関しておこる変化を解析した。すると、カドヘリンと相互作用するがその機能がわかっていない分子であるp120に関して、p120のリン酸化レベルが、接着の回復と相関して低下することを示唆する結果を得た。

そこで次に、p120の脱リン酸化とカドヘリンの活性化との因果関係をより直接的に明らかにする目的で、p120及びカドヘリンの変異分子を作製しColo205細胞の導入する実験を行った。p120は911アミノ酸からなる分子で、中央の347-819アミノ酸領域に10回のアルマジロリピート(AR)を有する。このAR領域はp120とカドヘリンの相互作用に必須であることからこの領域を外して部分欠失変異分子を作成しColo205細胞に導入したところ、N末346アミノ酸を削った分子にこの細胞のカドヘリンを活性化させる働きがあることが明らかになった。この結果から、N末を削った分子が、カドヘリンを不活性化するという内在性のp120の働きに対してドミナントネガティブに効いている可能性が示唆された。さらに、N末346アミノ酸領域を詳細に解析したところ、N末244アミノ酸を削った分子にこの細胞のカドヘリンを活性化させる働きがあるのに対し、N末157アミノ酸を削った分子にこのような活性がないことが明らかになった。さらに、カドヘリンの細胞内領域中のp120が結合することが明らかになっている領域を欠失するカドヘリンの改変分子をColo205細胞に導入したところ、細胞間接着が誘導された。

以上の結果から、p120はカドヘリンの活性を負に制御するまったく新しいタイプのカドヘリン結合分子で、その158-244アミノ酸領域内にカドヘリンの機能を負に制御する領域があることが本研究によりはじめて示された。このp120は恐らくリン酸化によりカドヘリンの機能を制御しているものと思われる。

目次

要旨 3

第一章 序論 6

1. はじめに
2. 接着分子、カドヘリン
3. カドヘリンの機能制御
4. 本研究について

第二章 Colo205細胞の接着特性の解析 14

結果

1. Colo205細胞株
2. プロテインカイネース阻害剤の添加に伴うカドヘリンの機能回復
3. 細胞のトリプシン処理に伴うカドヘリンの機能回復
4. 細胞のトリプシン処理に伴うカドヘリンの局在の変化

考察

1. Colo205細胞の細胞間接着の誘導
2. カドヘリンによる強い接着と弱い接着
3. 癌転移とカドヘリン、カテニン
4. 分子レベルでの解明に向けて－第三章への導入

第三章 Colo205細胞の接着の回復における カドヘリン、カテニンの変化 34

はじめに

結果

1. 全細胞抽出物中のカドヘリン／カテニンの接着誘導前後での比較
2. 抗E-カドヘリン抗体による免疫沈降実験
3. p120のバンドシフトの原因の解析

考察

1. p120のリン酸化とカドヘリンの機能制御

第四章 p120 の機能解析 45

はじめに

1. アルマジロファミリー
2. p120 の由来
3. p120サブファミリー
4. p120 とカドヘリンの機能制御

結果

1. p120 のN末欠失分子の作成
2. p120 のN末欠失分子をColo205 細胞へ導入したときの効果
3. p120 のN末領域の解析
4. p120 のN末欠失分子のリン酸化
5. 変異p120 とカドヘリン／カテニンの相互作用
6. p120 のN末欠失分子を他の細胞へ導入したときの効果

考察

1. p120はカドヘリンの負の制御因子である
2. p120のリン酸化とカドヘリンの制御
3. p120のリン酸化部位、セリン vs チロシン
4. p120と α -カテニンの相互作用／カドヘリンのクラスタリング
5. 生体内でのp120の機能は何か？
6. その他の今後の課題

第五章 材料 方法 77

第六章 参考文献、他 87

1. 参考文献
2. 謝辞
3. 主論文2

第一章

序論

第一章 序論

1-1. はじめに

われわれの体は60兆という途方もない数の細胞から成り立っている。しかもこの膨大な数の細胞がただ単に寄り集まっているものではない。それぞれの細胞の振る舞いは完全にコントロールされている。たとえば、個々の細胞はしかるべき時期に増殖を開始し、停止する。また脳、肝臓、筋肉などといった器官では、周囲の細胞、組織からの入力に従い、全く性質の異なる細胞が自らに課せられた役割を忠実に果たしている。多細胞生物では、細胞ひとつひとつが個体という巨大な機械の歯車として厳密に機能し、全体としての秩序を想像を絶するような高いレベルで保っているのである。

発生とは、一つの受精卵細胞から複雑な多細胞体が出来上がる過程のことであるが、別のみかたをすれば、秩序を維持する仕組みが形成される過程であると解釈することもできる。発生の際秩序が正しく構築されなかった個体は、多くの場合形態になんらかの異常が検出される。そこで、遺伝学的手法や移植などの方法により発生に異常が認められる個体を作製し、得られた個体を用いた研究の結果、多細胞生物内における秩序の実体はかなりわかってきた。また、癌の原因の一つが細胞社会の秩序が維持できなくなったことによることが明らかになった。癌由来の細胞を研究に用いて無秩序になった原因を明らかにすることにより、正常な個体内における秩序の実態に迫ることが可能になった。これらの研究の結果、カイネースや成長因子、転写因子などの遺伝子が相次いで同定される一方、分化誘導や細胞死という概念が発見されるなど、細胞間相互作用の研究は大きく発展した。

1-2. 接着分子、カドヘリン

個体内での秩序を維持するためには個々の細胞がコミュニケーションしなければならない。近年の分子生物学の発展によって、このコミュニケーションの手法について多くのことが明らかになった。そのなかに、細胞と細胞のコンタクトを介したコミュニケーションがある。たとえば、隣にいる細胞が自分と同じ性質のものか否かを、この接着を介したコミュニケーションにより細胞は知ることができる。Towens と Holtfeter は、イモリ胚から複数の組織を取り出しいったんバラバラにした後にこれらを再集合させると、単に細胞塊ができるにとどまらず、異なる組織由来の細胞がこの細胞塊のなかで混ざらずに存在することを明らかにし、この結果をもとに選択的接着性という概念を提唱した (Towens and Holtfeter, 1955)。また、免疫系のT細胞は接着を介したコミュニケーションにより外敵を特異的に認識し攻撃する。さらに、脳の神経回路網のような、極めて複雑な構造体の形成の過程で特定の細胞が決まった相手を認識する際に、接着を介した情報のやり取りを行っていることが明らかになっている。

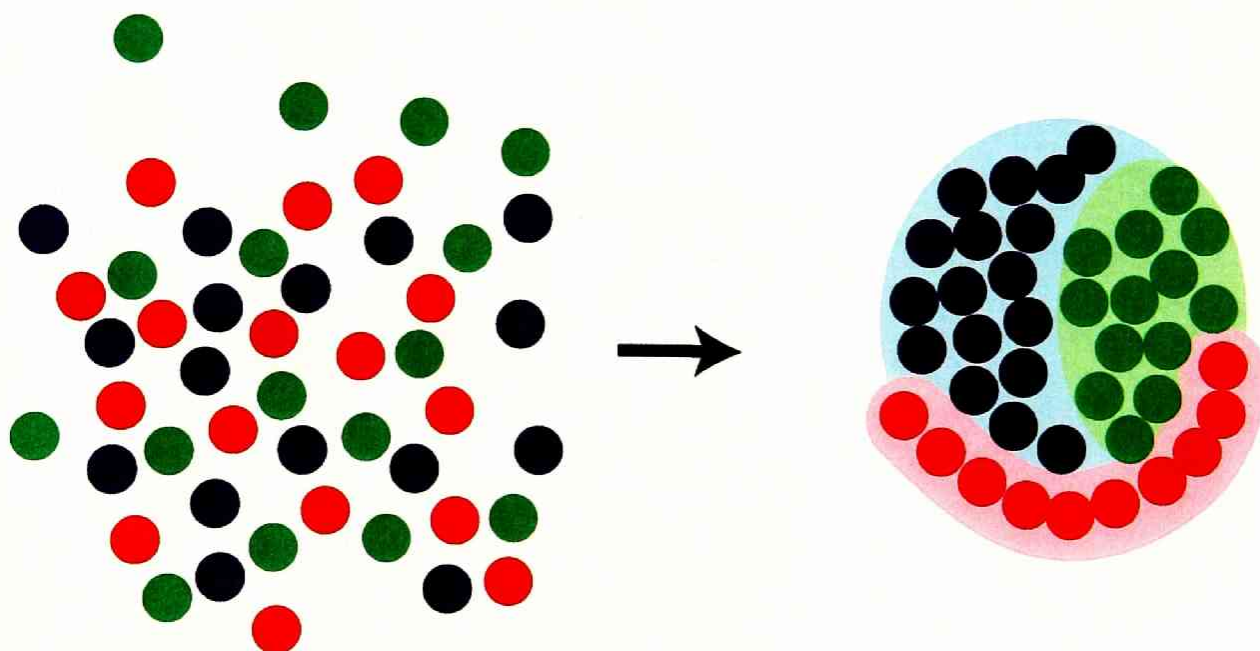


fig.1-1 選択的接着性

由来の異なる細胞をバラバラにしたあと、旋回培養し再集合させると由来が同じ細胞が選択的に集合塊を形成する。

その後、この接着を介したコミュニケーションを担う分子が多数同定されたが、その多くは細胞どうしをくっつける働きのあるタンパク質、細胞接着分子であった。細胞間接着を担う接着分子は大きくカドヘリンファミリーと免疫グロブリンファミリーに分けられる。カドヘリンは一回膜貫通型の膜タンパク質で、この分子群に属する分子はセキツイ動物だけでなくウニ、線虫、ショウジョウバエなどの無セキツイ動物でも見つかっている。これらの分子の共通する性質としては①細胞外領域にカドヘリンリピートと呼ばれる共通の反復構造をもつ②カルシウムイオンがなければ接着活性を示さない③ホモフィリックな結合能を示す④サブタイプ間で選択的な接着親和性を持つことなどが挙げられる。さらに初期発生時にサブタイプ間で相補的な発現を示すことがこれまでに明らかになっており、これらのことから、形態形成を担う重要な分子であると考えられている (Takeichi, 1988; 1991; 1993; 1995; Chitae and Troyanovsky, 1998)。

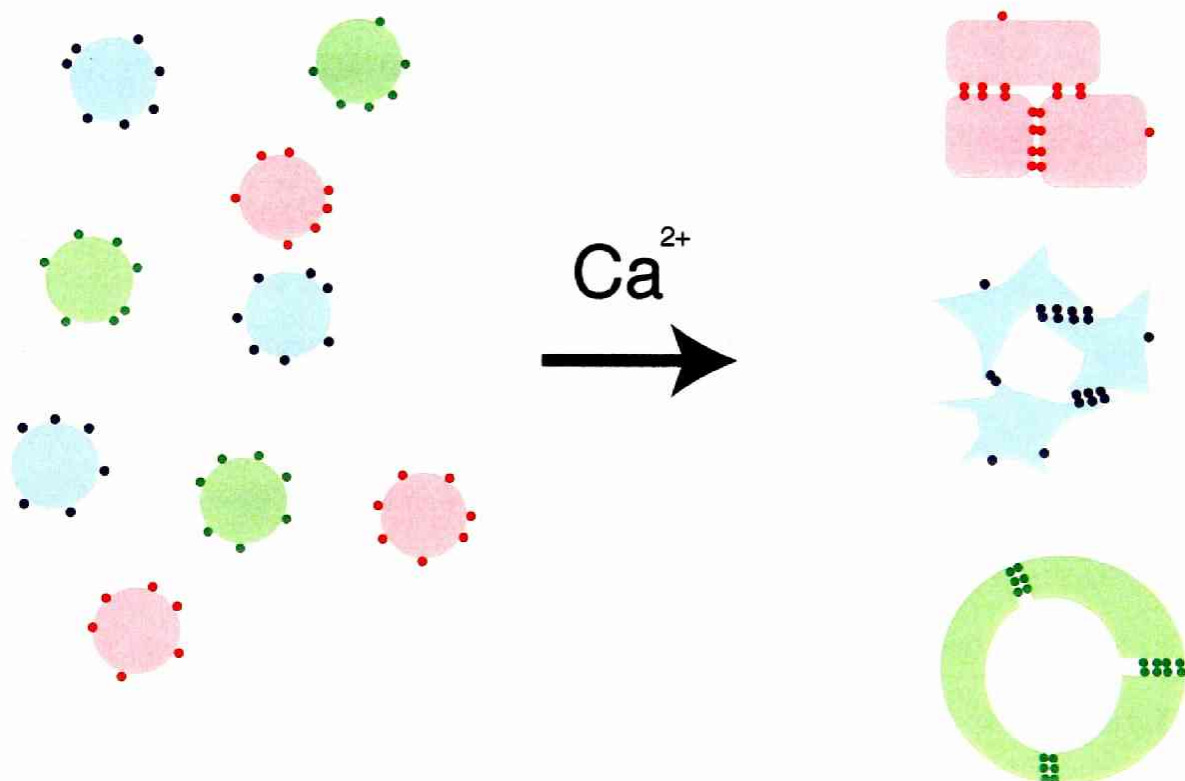


fig.1-2 カドヘリン分子の特性

①カルシウムイオン存在下で接着活性を示す②ホモフィリックな結合能を示す③サブタイプ間で選択的な接着親和性を持つことなどが挙げられる。

cadherin-catenin complex

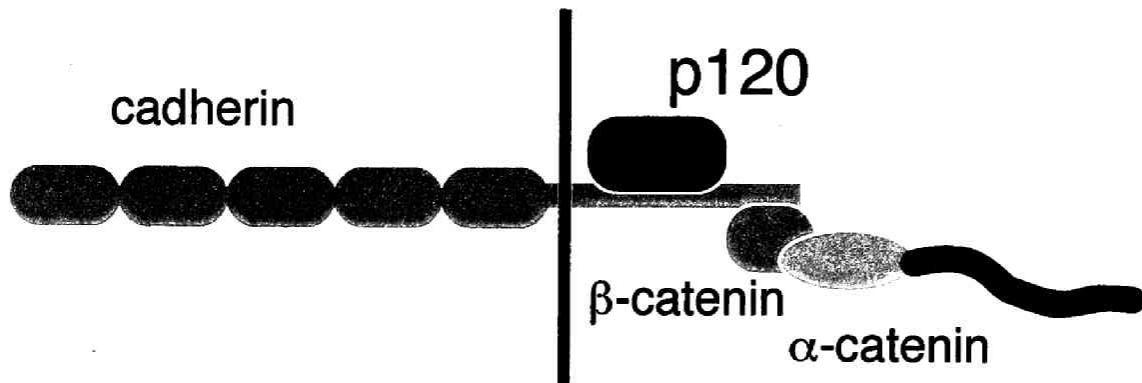


fig.1-3 カドヘリン／カテニン複合体

β -カテニン. p120 は直接カドヘリンに結合し、 α -カテニンは β -カテニンを介してカドヘリンと相互作用していることがわかっている。 α -カテニン、 β -カテニン、p120 は、抗カドヘリン抗体に対する免疫沈降により、まとめて回収できる。

1-3. カドヘリンの機能制御

カドヘリンはその細胞内領域で様々な分子と相互作用し、これらの分子とともにダイナミックな形態形成運動などの現象に寄与することが知られている。Hiranoらはカドヘリンがアクチンフィラメントと相互作用する可能性を示した(Hirano et al., 1987)。一方、Nagafuchiらは細胞質領域を欠くカドヘリンは接着分子として機能できないこと示し(Nagafuchi and Takeichi, 1988)、この結果から、カドヘリンが接着分子として機能するにはカドヘリンが細胞内領域を介してアクチン骨格系と相互作用することが必要であることが示唆された。その後、その細胞質領域でカドヘリンに結合する分子が相次いで同定された。カドヘリンはまず β -カテニンと相互作用し、さらに β -カテニンを介して α -カテニンと相互作用していることが明らかになった(McCrea et al., 1991; Nagafuchi et al., 1989, 1991; Tsukita et al., 1992)。 α -カテニンはビンキュリンと相同な領域を含むことから、アクチンと直接相互作用していることが期待されたが、最近になり α -カテニンがアクチン自身と相互作用していることが示された(Rimm et al., 1995)。その一方で α -カ

テニンが α -アクチニンやビンキュリンと相互作用するという報告もある(Knudsen et al., 1995; Watabe-Uchida et al., 1998)。カドヘリンはこれらの分子を介してアクチンフィラメントと相互作用すると考えられている (fig.1-3)。また、 α -カテニンを欠失しているためにカドヘリンを発現しているにもかかわらず接着できない細胞株が多数同定されている。このような細胞株に α -カテニンのcDNAを導入するとカドヘリンの機能が回復することが示された。以上のことから α -カテニンは、カドヘリンの機能に必須であることが明らかになった (Hirano et al., 1992; Oyama et al., 1994; Watabe et al., 1994; Shiozaki et al., 1996; Torres et al., 1997; Bullious et al., 1997; Roe et al., 1998)。

細胞が接着することは多細胞生物にとり必須の現象であるが、カドヘリンなどの接着分子が発現とともに活性を持つと、色々な局面で不都合が生じる。間充織細胞の凝集や神経冠細胞の離脱など、初期発生においては極めて短い時間内に細胞が接着したりバラバラになったりすることを繰り返す現象が知られている。例えば、マウス胚の8-16細胞期に、緩やかに接していた細胞が、突如胞胚と呼ばれる上皮細胞からなる構造体を形成するようになる (Fleming and Johnson, 1988)。このコンパクションと呼ばれる現象の際に

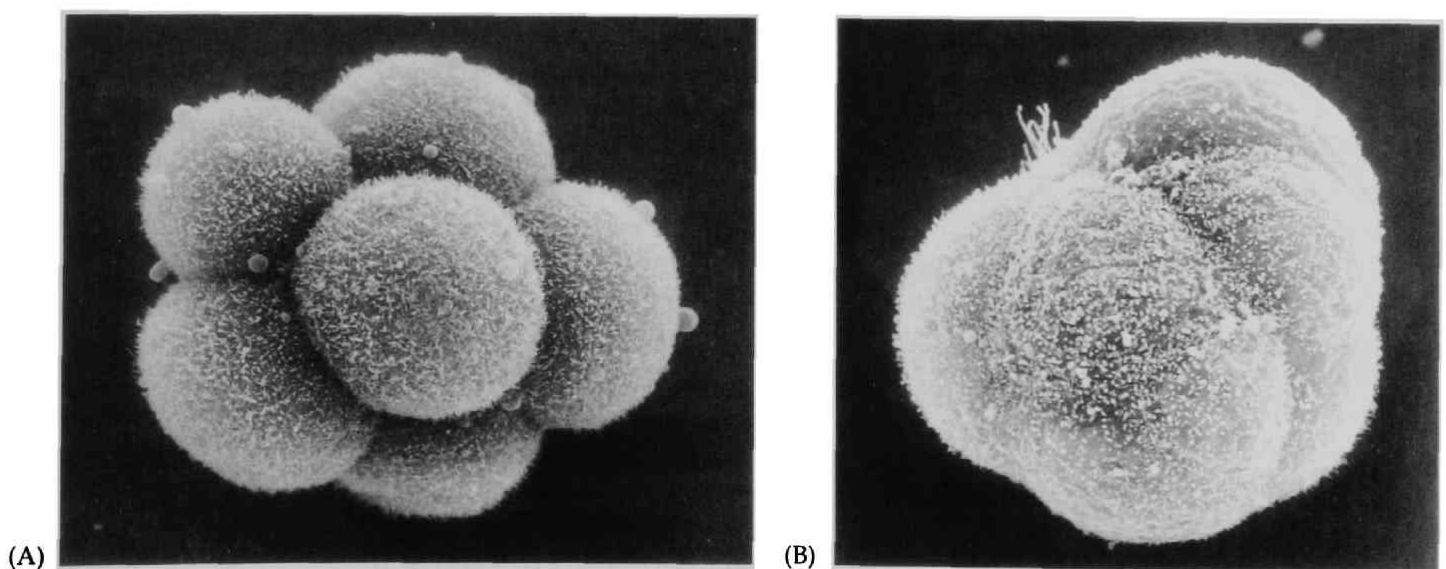


fig.1-4 コンパクション (Scott F. Gilbert著 Developmental Biology 4 th eds. より)

は、カドヘリンの活性が短時間で上昇するが、コンパクションを起こす前の緩やかに接している状態の細胞でカドヘリン分子は十分に膜表面に存在することから、この活性の変化は翻訳後の修飾などによりカドヘリンの活性が制御されている結果であると考えられている(Gumbiner, 1996)。

カドヘリンの活性がいかに制御されているかについては、培養細胞を用いた実験系ですでにいくつかの興味深い知見が得られている。Matsuyoshiらは、カドヘリンが機能しているラット繊維芽細胞株 3Y1に *v-src* 遺伝子を導入し強制発現させると β -カテニンのチロシン残基がリン酸化され、それにともないカドヘリンの活性が低下することを見出した(Matsuyoshi et al., 1992)。この他にも β -カテニンのリン酸化がカドヘリンの機能制御にかかわっている可能性を示唆する報告が多数ある(Hamaguchi et al., 1993; Shibamoto et al., 1994; Shibata et al., 1996; Serres et al., 1997; Ryuto et al., 1997; Liu et al., 1997; Calautti et al., 1998; Ozawa and Kemler, 1998a; Balsamo et al., 1998)。また、膜貫通型のチロシンフォスファタース PTP μ や、EGFレセプターがカドヘリンと相互作用していることが示され(Brady-Kalnay et al., 1995; Hoschuetzky et al., 1994; Takahashi et al., 1997; Hazan et al., 1997)、これらの分子によりカドヘリンの活性が制御されている可能性が示唆された。これらの他にも、アクチンの制御因子として知られている *rho* や IQGAP の関与など(Takaishi et al., 1994; 1997; Kuroda et al., 1998)、カドヘリンの機能制御についてはこれまでに数多くの報告があり興味深い知見が得られている。

最近になり、p120 という分子がカドヘリンと結合していることが相次いで報告された(Reynolds et al., 1994; Shibamoto et al., 1995; Staddon et al., 1995; Aghib and McCrea, 1995)。p120 はもともと *v-src* により形質転換した細胞において特異的にリン酸化されている分子量が120 kDa の分子として同定された(Reynolds et al., 1989)。一次構造を決定したところ β -カテニンやその *Drosophila* の相同分子 Armadillo (セグメントポラリティ遺伝子のひとつ) に特有のリピート構造を持つことが判明した(Reynolds et al., 1992; Peifer et al., 1994)。そこで、カドヘリンとの相互作用を検討したところカドヘリンと直接結合していることが示された。さらに正常上皮細胞を分散させる活性を持つ肝増殖因子(HGF/SF)で細胞

を処理すると、カドヘリンの不活性化に呼応して p120 のリン酸化が認められた (Shibamoto et al., 1995)。p120 と β -カテニンとの相同性や、この分子がもともとカイネーシスの基質として同定された経緯から、カドヘリンの機能を制御する新規分子ではないかと期待されているが、この分子の機能とそのカドヘリン接着にはたす役割は現在のところあまりよくわかっていない。

1-4. 本研究について

カドヘリンの機能制御に関する研究の流れは大きく二つに分けられる。一つ目のアプローチは Matsuyoshi ら (1992) が行ったように、カドヘリンが機能している細胞を細工してその機能を阻害しそこからせまる方法である。そしてもう一つのアプローチは、Hirano ら (1992) が行ったようにカドヘリンが発現しているにもかかわらずこれが機能していない細胞で、そのカドヘリンをなんらかの方法で活性化し、そこからせまる方法である。

今回私が用いたアプローチは後者に属する。ヒト大腸癌由来の細胞株 Colo205 はカドヘリンを発現しているにもかかわらず、お互いに接着できない。私は、その原因を調べる研究を行った。その結果、カドヘリンの機能制御の新しいメカニズムが存在することを示唆する結果を得た。

本論は大きく三つに分けた。第二章では Colo205 の特徴、特にこの細胞を用いてカドヘリンの活性を任意に操作できる系を発見したのでこの系について報告する。引き続いて、この系を用いてカドヘリンの機能制御について検討したところ、前出の p120 の関与を強く示唆する結果を得たので、それ第三章で紹介する。最後に、第四章では p120 やカドヘリンの改変分子を用いて p120 の機能を探った実験の結果と、その結果の解析から得られた p120 の役割についての知見を考察した。

第二章

Colo205細胞の接着特性の解析

第二章 Colo205細胞の接着特性の解析

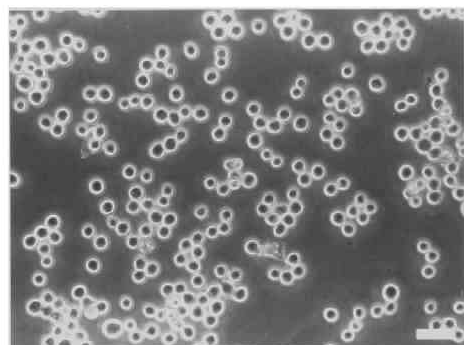
2-1. 結果

2-1-1. Colo205細胞株

Colo205細胞は Sempleらが¹⁾大腸癌患者の腹水から樹立した細胞株で、上皮細胞由来であることがすでに明らかになっている (Semple et al., 1978)。この細胞は通常の培養条件下ではfig. 2-1のように丸い形をしていて、細胞どうしは緩やかに接してはいるが強固な細胞間接着は全く認められず、また培養皿にもほとんど接着しない。一般に、上皮系の細胞でありながらこのような形態を示す細胞では、カドヘリンが正常に機能していない例が多く知られ (例・ヒト肺癌由来のPC9)、その場合の多くは、カドヘリンもしくはカテニンに発現量の減少、点突然変異や部分欠失変異などの異常が見つかった。そこ

fig.2-1 Colo205細胞の形態

Colo205細胞は、通常培養条件下ではお互いにほとんど接着していない。また、培養皿とも緩くしか接着しておらず、ピペットイングで容易に培養皿からはがすことができる。
Bar, 40 μ m。



で、ウエスタンブロット法でこの細胞のカドヘリン(この細胞は上皮系なのでE-カドヘリン)、 α -カテニン、 β -カテニン及びp120の発現量と分子量を調べた。しかし、いずれについても十分な量が発現していた。また分子量については、p120が複数のバンドとして検出されたほかは、いずれも予想される位置に一本のバンドが検出され、注目に値するは異常は認められなかった (fig. 2-2)。

タンパク質は発現しているが局在に異常がある可能性が考えられたので、次にこれらの分子の細胞内局在を免疫組織化学法で調べた。すると、E-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニンのいずれも細胞膜に沿った局在を示した (fig. 2-3)。なお、 β -カテニンは一部細胞の核に局在が認められた。さらに、この細胞が発現しているカドヘリン、カテニンが接着活性を持っているかを検討した。Colo205細胞をピペッティングで完全にばらばらにし旋回培養すると培養開始後3時間で大きな集合塊が形成された (fig. 2-4)。しかも、この旋回培養中の試料にカドヘリンの機能阻害抗体を加えると集合塊の形成が抑えられた。このことからColo205細胞は接着活性のあるカドヘリン、カテニン分子を発現していることが明らかになると同時に、この細胞ではなんらかの理由でそれらが強固な細胞間接着を構築できないことが示唆された。そこで、その原因を探ることにした。

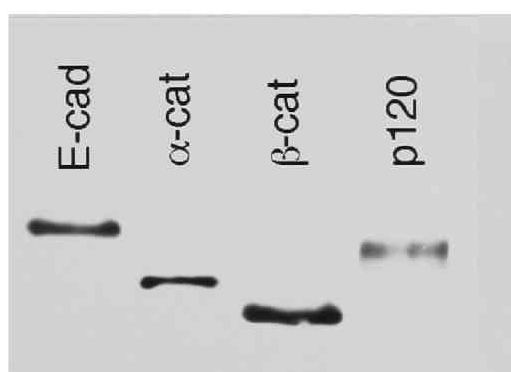


fig.2-2 Colo205細胞のE-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニン、p120の発現

Colo205細胞のE-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニン、p120をイムノブロット法で検出した。p120が複数のバンドとして検出されたほかは、いずれも予想される位置に一本のバンドが検出された。

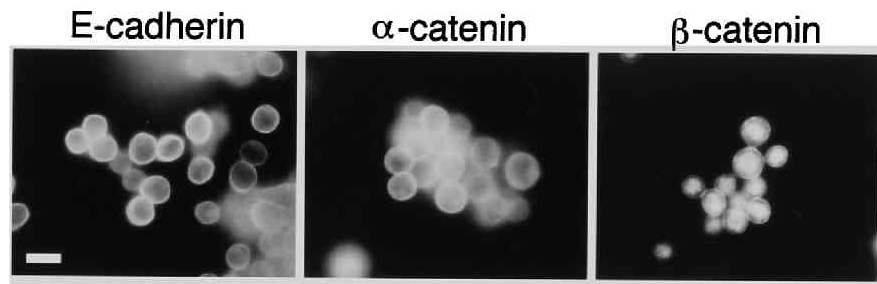


fig.2-3 Colo205細胞のE-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニンの細胞内局在

Colo205細胞のE-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニンを細胞組織化学法で検出した。いずれも細胞膜にそって一様に分布していることが確認された。 β -カテニンは一部が核にも局在していることが観察された。Bar, 20 μ m。

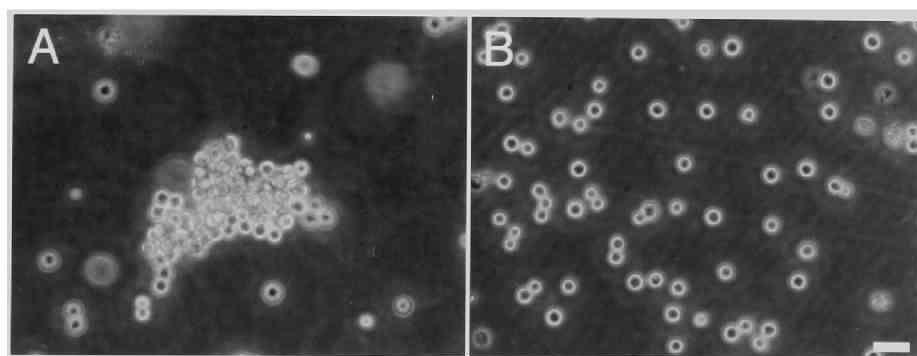


fig.2-4 Colo205細胞のE-カドヘリン、 α -カテニン および β -カテニンは接着性を保持している

Colo205細胞をピペッティングで完全にばらばらにし旋回培養すると培養開始後3時間で大きな集合塊が形成された(A)。しかし、この旋回培養の際にカドヘリンの機能阻害抗体を加えると集合塊の形成が抑えられた(B)。Bar, 40 μ m。

2-1-2. プロテインカイネース阻害剤の添加に伴うカドヘリンの機能回復

Colo205細胞は c-src カイネースの活性が上昇していることがすでに報告されている (Park et al., 1993)。一方 Matsuyoshi らにより、細胞内での異常なタンパク質リン酸化反応にともないカドヘリンが機能できなくなる例が報告されている (Matsuyoshi et al., 1992)。そこで、プロテインカイネースの阻害剤をこの細胞の培養に加え、それらが細胞間接着に与える影響を調べた。いくつか試した中でまず、プロテインカイネースC (以下PKCと記す)、プロテインカイネースA (以下PKAと記す) などの阻害剤である staurosporine に細胞間接着を誘導する活性が認められた。7.0 nM の staurosporine 添加後 6 時間培養すると

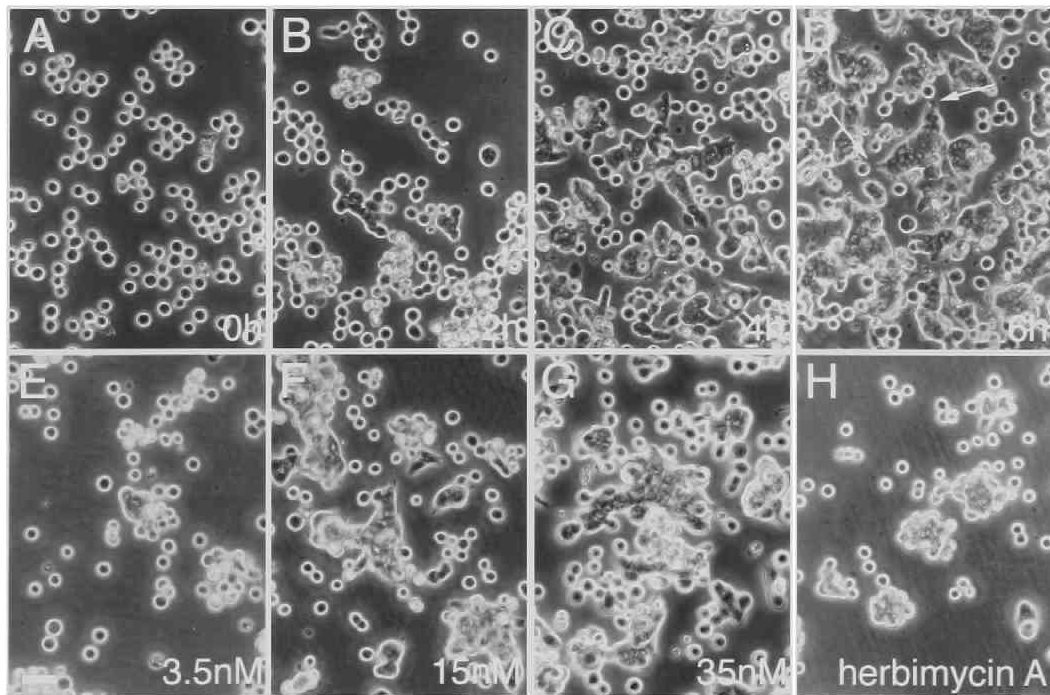


fig.2-5 staurosporine及びherbimycinAがColo205に及ぼす効果

(A) - (D), 7.0nM の staurosporine 存在下での Colo205 細胞の形態の変化。(A), 添加直後; (B), 添加2時間後; (C), 添加4時間後; (D), 添加6時間後。staurosporine 添加後2時間ごろから細胞間接着が観察された。(D) の矢印で示したように各コロニーが突起を伸ばしていることから、細胞-基質間接着も同時に回復していると思われる。(E) - (H), 様々な濃度の staurosporine を加えて6時間培養後の Colo205 の形態。(E), 3.5nM; (F), 15.0 nM; (G), 35 nM。3.5 nM 以上の濃度で、細胞間接着の回復が認められた。(H), 1 µg/ml の herbimycin A を加えて24時間培養後の Colo205 の形態。細胞間接着が誘導された。Bar, 40 µm。

fig.2-5で示したように細胞間接着の誘導が認められた。通常の培養条件下で見られる細胞塊は個々の細胞の形態が判別できるのに対し、7.0 nMのstaurosporineを添加した際に見られる細胞塊では細胞どうしが強く接着しているため個々の細胞の形態は判別できない（なお、本編では今後前者を“ルーズな集合塊”、後者を“コンパクトな集合塊”と呼ぶことにする；本編fig.2-13、31ページ参照）。一方、多くのコロニーが突起を伸ばし培養皿と強く接しており（fig.2-5D, 矢印）、このことから、細胞間接着のみならず細胞-基質間の接着も回復していることが示唆された。さらに、v-srcカイネースなどの阻害剤であるherbimycin Aにも弱いながら同様の活性が認められた（fig.2-5H）。herbimycin Aの場合、6時間の培養では目立った効果は見られなかったがさらに培養を続けると24時間後に細胞間接着の誘導が認められた。

さらに staurosporine の濃度を変えて同様の実験を行った。staurosporine 添加後6時間培養すると3.5 nM以上の濃度で接着誘導が認められた。

staurosporine はPKC やPKA の阻害剤として知られている。そこで次に、PKCに対する特異性が staurosporine よりも高い阻害剤であるUCN-01, calphostin C (Takahashi et al., 1990) を用いて同様の実験を行った。しかし、PKCの活性を抑えるとされている濃度をそれぞれ培養に加え6時間培養したが、細胞間接着は誘導されなかった。さらにPKAの阻害剤であるH-8 は、PKA に対する阻害効果がみられるといわれている濃度の30倍量を培養に加えてもColo205細胞の接着を誘導させなかった。herbimycin Aはv-srcカイネースの阻害剤として知られている。そこで、別の v-srcカイネースの阻害剤 genestein の接着を回復させる活性を検討した。EGF-receptor カイネース (EGF-R)の阻害剤 tyrphostin を過剰量加えても効果がなかった。なお、培養に各阻害剤を添加し24時間後の効果を table. 1 にまとめた。

staurosporine	35 nM	15 nM	7.0 nM	3.5 nM	0.7 nM
	+	+	+	+	
UCN-01	100 nM	50 nM	10 nM	5 nM	1 nM
	-	-	-	-	
calphostin C	200 nM	100 nM	50 nM	10 nM	5 nM
		-		-	-
herbimycin A	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml	0.2 µg/ml	0.1 µg/ml
	(+)	(+)		-	-
tyrphostine	150 mM	75 mM	30 mM	15 mM	7.5 mM
	-	-	-		
genestein	78 mM	39 mM	26 mM	13 mM	6.5 mM
				-	-

Table.1 (左ページ) 様々なプロテインキナーゼ阻害剤がColo205の細胞間接着に及ぼす効果

Colo205細胞に添加し6時間培養後形態を観察した。+; 接着の誘導を検出、-; 誘導を検出せず。herbimycin A は6時間後では効果はなかったが24時間後に細胞間接着の誘導を検出した。その他のものについては、staurosporineに限って接着の誘導が観察された。それぞれの阻害剤の酵素に対する特異性とその酵素活性を50%抑えるのに十分な濃度は以下のとおりである: Staurosporine, 2.7 nM for PKC, 8.2 nM for PKA, and 6.4 nM for p60^{v-src}; UCN-01, 4.1 nM for PKC, 42 nM for PKA, and 45 nM for p60^{v-src}; Calphostin C, 50 nM for PKC, >50 mM for PKA and p60^{v-src}; Herbimycin A, 5 µg/ml for p60^{v-src} and p60^{v-abl}; Tyrphostin, 15 mM for EGF receptor; Genestein, 22.6 mM for EGF-receptor, and 25.9 mM for p60^{v-src}

プロテインキナーゼの阻害剤により誘導される形態の変化が可逆的なものなのか、それとも細胞の分化のような不可逆的なものなのかを次に調べた。7.0 nMのstaurosporine存在下で24時間培養し細胞間接着を誘導した細胞を、staurosporine非存在下でさらに24時間培養した。すると、多くの細胞の形態は元の丸いものに戻った (fig. 2-6)。このことから、staurosporineによる細胞間接着の誘導は可逆的な現象であることが明らかになった。

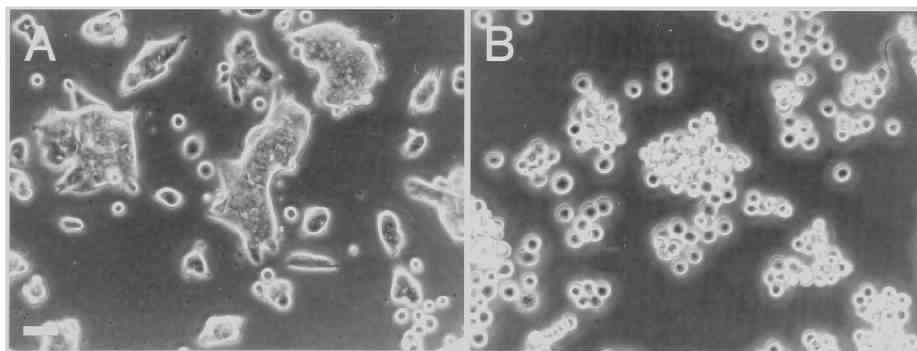


fig.2-6 staurosporine除去によるColo205細胞の形態の変化

7.0 nMのstaurosporine存在下で24時間培養し細胞間接着を誘導した細胞をさらに24時間 staurosporin 存在下 (A)、もしくは非存在下 (B) で培養した。staurosporin を除くと24時間で最初の丸い形態に戻った。Bar, 40 µm。

staurosporine と herbimycin A が細胞間接着を誘導したので、つぎにこの接着がはたしてE-カドヘリンを介した接着であるかどうかを調べる目的で、阻害剤と同時にE-カドヘリンの機能阻害抗体を加え培養する実験を行った。すると、staurosporine のみ加えた培養では培養開始後6時間で細胞間接着が観察されたのに対し、staurosporine に加えさらに抗体を加えるとこの接着が阻害された (fig.2-7)。このことから staurosporine が誘導する接着はE-カドヘリン依存性であることがわかった。同様に herbimycin A が誘導する接着もE-カドヘリン依存性であることが明らかになった (結果省略)。

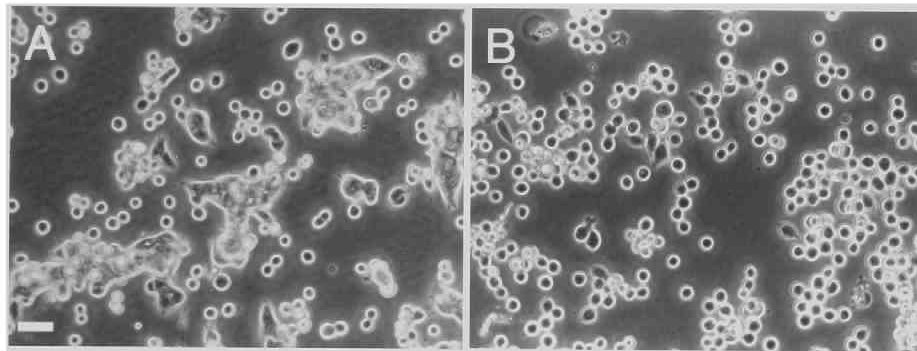


fig.2-7 staurosporineの誘導する細胞間接着は E-カドヘリン依存性である

staurosporineと同時にE-カドヘリンの機能阻害抗体を加えて6時間培養した。抗体を加えなかったサンプルではも細胞間接着が回復しているにもかかわらず (A)、抗体を加えると、接着は回復しなかった(B)。Bar, 40 μm 。

2-1-3. 細胞のトリプシン処理に伴うカドヘリンの機能回復

Vleminckxらは、転移性の癌細胞において細胞表面上に大量に存在するプロテオグリカンが物理的な障害物となってカドヘリンが機能するのを妨害していて、これらを薬剤処理で除くとカドヘリンの機能が回復し、*in vitro*での転移活性も低下することを報告している (Vleminckx et al., 1994)。また Kempermanらはマウス乳癌由来の細胞株 TA3/Ha をエンドペプチダーゼで処理し細胞表面のムコ多糖を分解すると、カドヘリン依存性の細胞間接着が誘導されることを報告している (Kemperman et al., 1995)。さらに、WesselingらによりColo205細胞がムコ多糖の一種であるMUC1 (episilinin)を発現していることが報告された (Wesseling et al., 1996)。TA3/Ha細胞の形状がColo205細胞によく似ていること、Colo205細胞がMUC1ムチンを大量に分泌していることから、Colo205細胞においても細胞表面にあるムコ多糖やプロテオグリカンなどが物理的にカドヘリンが機能するのを妨害している可能性が考えられた。一方、カドヘリンは1 mMのカルシウム存在下ではトリプシンによる分解を受けないことがわかっている (Takeichi et al., 1977)。そこでこの細胞表面上にあるカドヘリン以外の分子を選択的に除くために、この細胞をカルシウム存在下でトリプシン処理 (以下TC処理と記す)した。血清中にはプロテアーゼの阻害剤が入っていることから無血清培地 (DH; 1.8 mM Ca^{2+} を含む) 中に細胞をまき、0.001 %のトリプシンを加えこの細胞を培養した。すると培養開始後30分で細胞間接着が回復した (fig. 2-8)。また、staurosporine処理時に見られたような細胞基質間接着の促進がTC処理でも認められた (fig. 2-8C矢印)。なお、Kempermanらが用いたエンドペプチダーゼ、*O*-sialoglycoprotein endopetidase は Colo205の細胞間接着を回復させなかった (結果省略)。

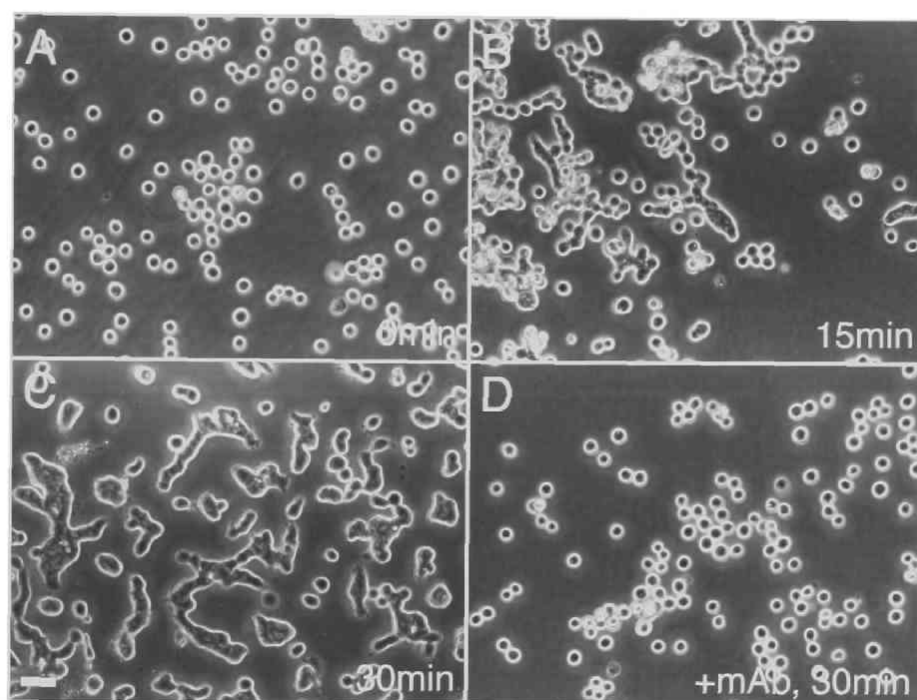


fig.2-8 トリプシンによる Colo205細胞の接着の誘導

(A)-(C) Colo205細胞を Ca^{2+} 存在下で 0.001% のトリプシン処理した。(A), 処理開始直後; (B), 処理開始 15 分後; (C), 処理開始 30 分後。処理開始後 15 分で細胞間接着の誘導が観察された。(D) トリプシンにより誘導される接着はカドヘリン依存性である。0.001% のトリプシンと同時にカドヘリンの阻害抗体加えると細胞間接着は誘導されなかった。Bar, 40 μm 。

つぎに、トリプシンにより誘導される細胞接着がカドヘリン依存性のものであるかを検討した。staurosporine のときと同様に E-カドヘリンの機能阻害抗体を TC 処理中のサンプルに添加し培養を行った。すると、培養開始後 30 分でトリプシンだけ加えた TC 処理のサンプルでは細胞間接着が回復したのに対し、トリプシンに加え阻害抗体を添加したのでもでは細胞間接着の誘導が完全にブロックされた (fig. 2-8D)。この結果から、TC 処理により誘導される Colo205 細胞の細胞間接着は、E-カドヘリン依存性のものであることが明らかになった。

さて、トリプシンでカドヘリン依存性の細胞間接着が回復することがわかったので、次にどれくらいの濃度のトリプシンが効果をもたらすかを調べた。0.01%、0.001%、

0.0001% の3種類の濃度を検討した。すると0.001%と0.01%の濃度では培養開始後 30分で細胞間接着が回復した。さらに培養を続けると処理開始後 7時間で0.001 %では接着を維持していたが、0.01 %以上の濃度では細胞に対する毒性効果がみられた。0.0001%以下の低濃度では7時間培養後でも接着の誘導は認められなかった。さらにトリプシンを加えて接着を誘導させた培養からトリプシンを除き培養を続けると、細胞は最初の丸い形態に戻った。このことからトリプシンによる接着の誘導も staurosporine による接着の誘導と同じく可逆的な現象であることが明らかになった (結果省略)。

トリプシンは細胞表面にあるムコ多糖やプロテオグリカンを除去によることにより細胞間接着を誘導する可能性が考えられた。そこで、Colo205細胞で発現が認められているMUC1に対する抗体で、何も処理していないColo205細胞とTC処理により細胞間接着を誘導した細胞をそれぞれ染色した。すると未処理の細胞のみならず、30分のTC処理によって接着を誘導した細胞においても細胞表面にMUC1タンパク質が検出された (fig. 2-9)。さらに興味深いことに、接着が誘導された細胞で細胞どうしが接着している面にもMUC1タンパク質が存在していることが確認された(fig. 2-9B矢印)。

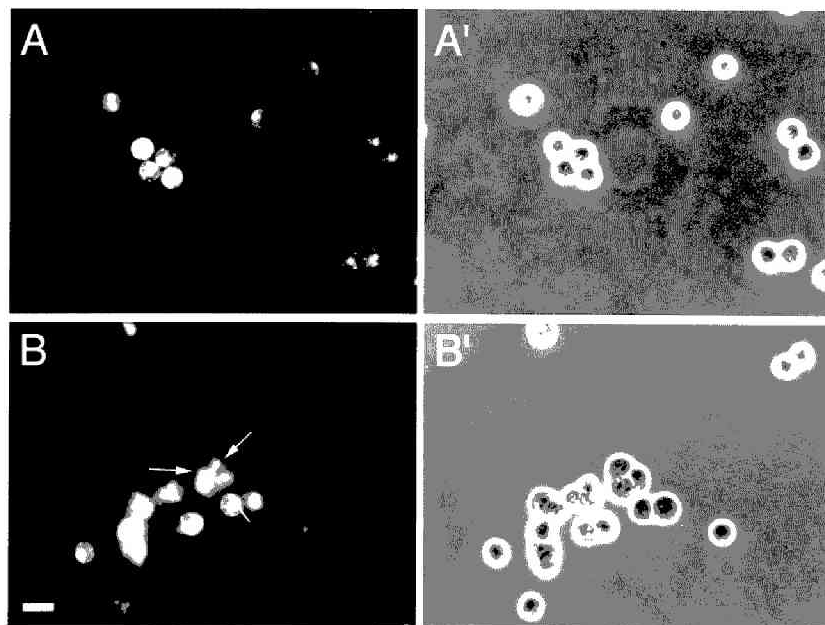


fig.2-9 TC処理した Colo205細胞の抗 MUC1抗体による染色

未処理のColo205細胞とTC処理により細胞間接着を誘導した細胞をそれぞれMUC1に対する抗体で染色した。未処理の細胞 (A) のみならず、30分のTC処理によって接着を誘導した細胞 (B) においても細胞表面にMUC1タンパク質が検出された。(A')、(B')はそれぞれ(A)、(B)の同一視野の位相差像。Bar, 20 μm 。

2-1-4. 細胞のTC処理に伴うカドヘリンの局在の変化

Colo205細胞の細胞間接着が誘導される際のカドヘリンの局在について検討した。未処理の細胞と staurosporine、トリプシンで細胞間接着を誘導した細胞をE-カドヘリンとカテニンの1つであるp120 に対する抗体で染色した。すると、未処理の細胞では細胞膜にそってほぼ一様にE-カドヘリンが分布したのに対し、接着が誘導された細胞では接着面にE-カドヘリンの局在が濃縮した (fig.2-10 A, C, E)。同様の局在の変化はp120 についても観察された (fig.2-10 B, D, F)。

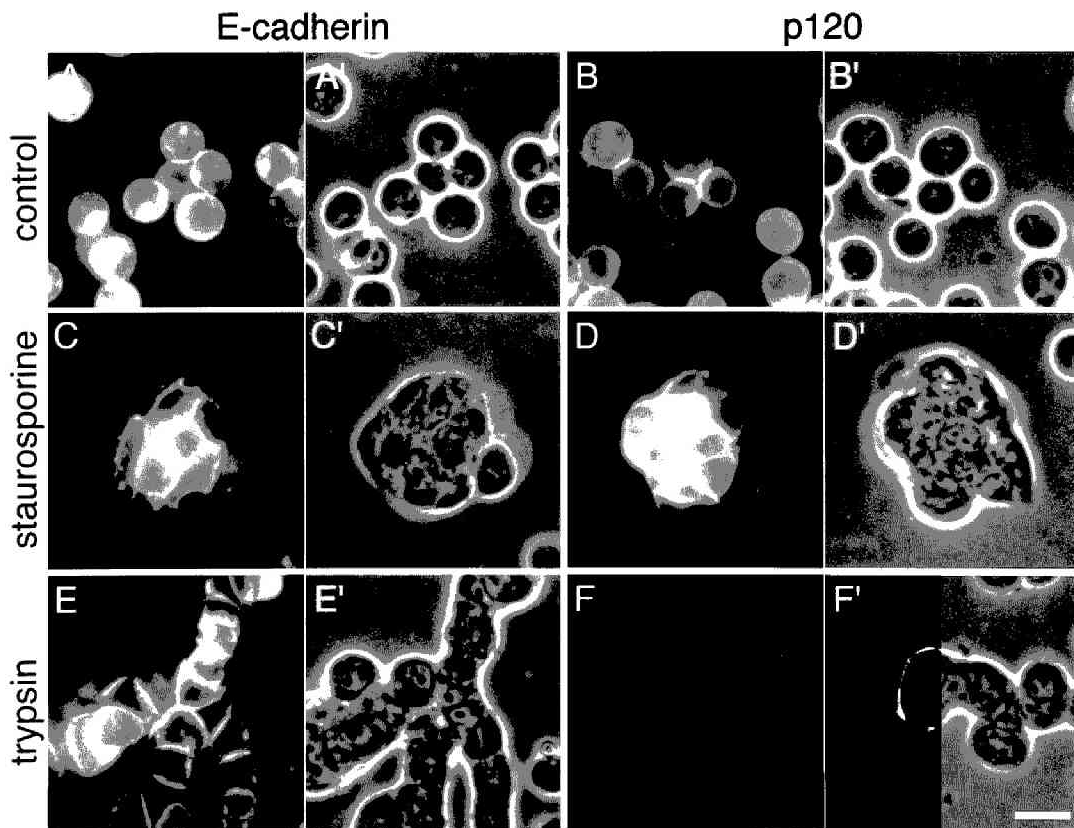
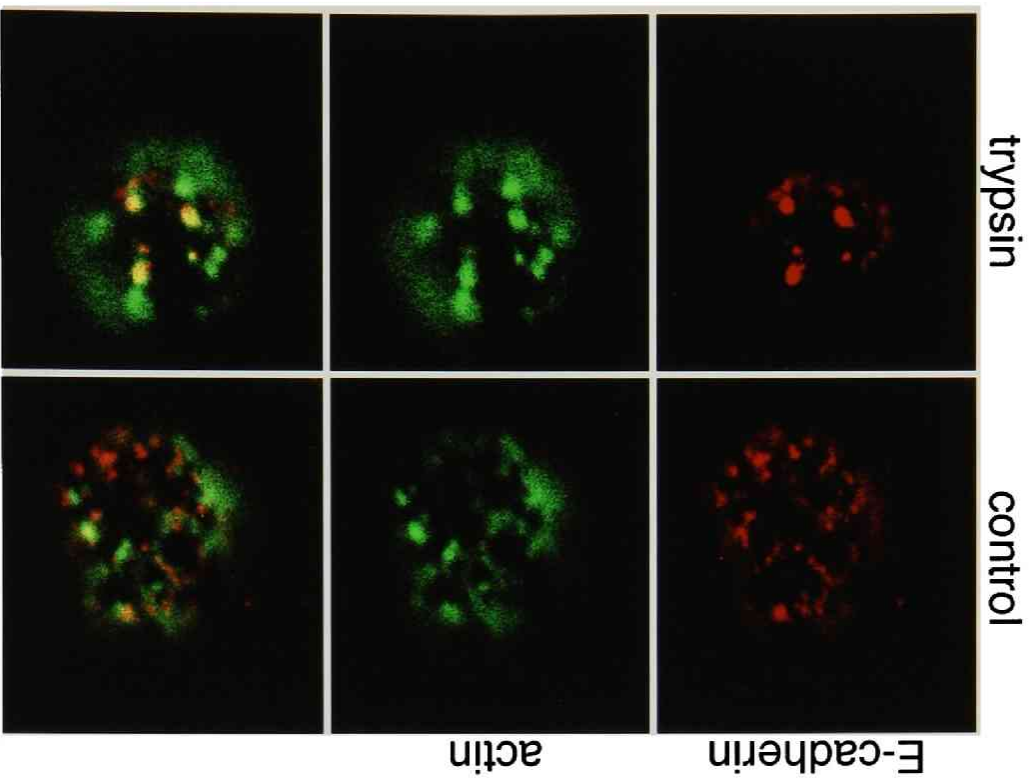


fig.2-10 接着誘導処理に伴う Colo205細胞のカドヘリンの局在変化

未処理の細胞 (A, B)、staurosporineにより接着を誘導した細胞 (C, D)、トリプシンにより接着を誘導した細胞 (E, F)のE-カドヘリン (A, C, E)、p120 (B, D, F) の局在を解析した。A'-F' は A-F の同一視野の位相差顕微鏡像である。未処理の細胞では細胞膜にそってほぼ一様にE-カドヘリンが分布したのに対し、接着が誘導された細胞では接着面にE-カドヘリン、p120の局在が濃縮した。Bar, 20 μ m。



このfig. 2-10の結果から、強固な細胞間接着ができない状態のColo205細胞では細胞膜上におけるカドヘリンの動きがなんらかの理由で制限されている印象を受けた。一方、カドヘリンはカテニンを介してアクチン細胞骨格系と相互作用することが、強固な接着構造の維持に必要であることが知られている (Barth et al., 1997)。そこで、接着できない状態のColo205細胞では、なんらかの理由によりアクチンとの相互作用が阻害されカドヘリンが正常に機能できないのではないかと考え、カドヘリンとアクチンの局在を検討した。アクチンなどの細胞骨格と相互作用するカドヘリン分子は界面活性剤による抽出に抵抗性を示すことがすでに明らかになっている (Hirano et al., 1987)。そこで、細胞骨格系と相互作用しているカドヘリンを選択的に検出するために、細胞を界面活性剤で処理したあと固定し、E-カドヘリンとアクチンの局在をコンフォーカル顕微鏡を用いて解析した。なお比較のため両サンプルとも、隣接する細胞と相互作用していない単独で存在する細胞を選んで観察した。未処理の細胞のカドヘリンをこの方法で検出したところ、意外にも多くのカドヘリンが界面活性剤により抽出されずに残っていた。しかも同時にファロイジン染色によりアクチンの局在と比較したところ、E-カドヘリンとアクチンの局在はあまり一致しなかった。このことは、カドヘリンがアクチン以外の細胞骨格系と相互作用していることを強く示唆している。一方トリプシンにより接着を誘導した細胞では、カドヘリンとアクチンの局在はかなり一致した。さらに、個々のカドヘリンのシグナルの大きさが未処理のものに比べて大きくなっていった。このことから、接着が回復した細胞では、個々のカドヘリン分子が細胞膜上でより大きなクラスターを形成していることが示唆された。

fig.2-11 (左ページ) 接着誘導処理によるColo205細胞のカドヘリンとアクチンの局在 未処理の細胞(上段)、トリプシンにより接着を誘導した細胞(下段)のE-カドヘリン(左)、アクチン(中央)の局在を解析した。カドヘリンとアクチンの両染色像を重ねたものを右に示した。なお比較のため両サンプルとも単独で存在する細胞を選んで観察した。

2-2. 考察

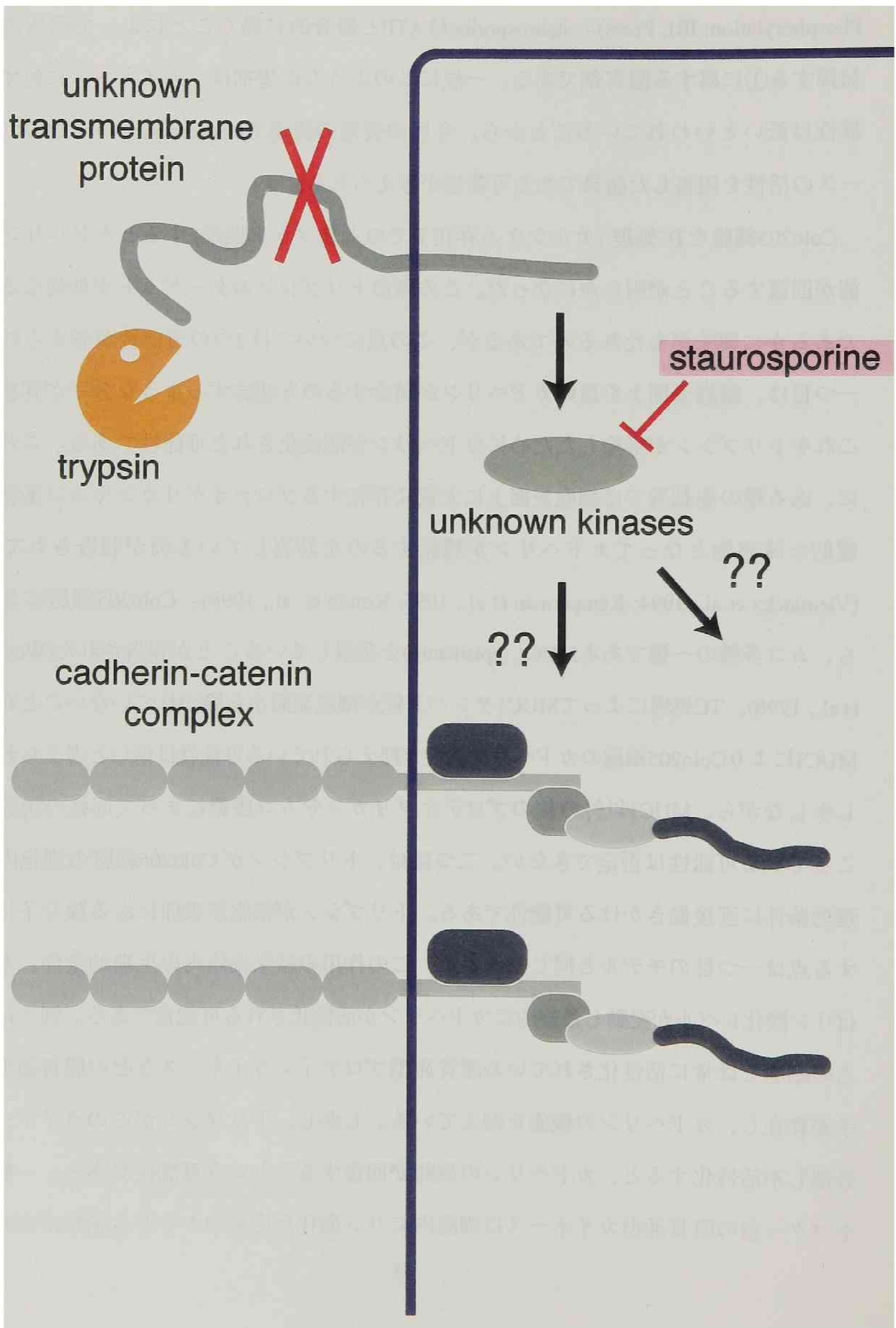
2-2-1. Colo205細胞の細胞間接着の誘導

カドヘリン、カテニンを発現している上皮細胞は、通常の培養条件下では上皮細胞特有の美しい一層からなるシートを形成する。しかし、ヒト大腸癌由来の細胞株 Colo205 は上皮由来の細胞株で、カドヘリン、カテニンを発現しているにもかかわらず、通常の培養条件下では丸い形を示す。このことから、この細胞ではカドヘリン／カテニンによる細胞間接着システムに異常があることが示唆された。ところが、この細胞をプロテインカイネーシスの阻害剤である staurosporine や herbimycin A で処理するとカドヘリン依存性の細胞間接着が回復した。このことからこの細胞は接着分子として機能できるカドヘリン／カテニン分子を持っていることが明らかになった。さらに、この細胞では、カドヘリンの機能を不活性化させうるカイネーシスが常に活性を持つために、通常の培養条件下ではカドヘリン／カテニンによる細胞間接着システムが機能できないと考えられた。staurosporine は PKC の阻害剤として知られている。そこでこの細胞間接着の活性化と PKC の不活性化との間に相関がある可能性が浮上した。しかし、PKC に対する特異性が staurosporine よりも高い阻害剤である UCN-01 や calphostin C (Takahashi et al., 1990) は効果がなかったことから、この可能性は低いと思われる。Colo205細胞はc-src カイネーシスの活性が上昇していることがすでに報告されてる。また、細胞内でカドヘリンが局在するアドヘレンスジャンクションにはc-src カイネーシスが豊富に存在することが知られている (Tsukita et al., 1991)。こうしたことから、このカイネーシスのカドヘリン不活性化への関与が示唆された。しかしながら、v-src の阻害剤である herbimycin A は効果を示したが genestein に効果がなかったことから、v-src カイネーシスの関与の可能性は低いものと考えられる。さらに、tyrphostin、H-8 にカドヘリンを活性化させる働きがなかったことから、EGF-R 等のカイネーシスのこの現象への関与の可能性は低いものと考えられる。

プロテインカイネーシス阻害剤は①カイネーシスのATP結合領域にATPと競合的に結合す

るもの、②カイネースの触媒部位に結合するもの、③カイネースの基質の認識部位に結合しカイネースと基質の接近を妨害するものの3種に大きく分けられる (Protein Phosphorylation; IRL Press)。staurosporineはATPと競合的に働くことによって阻害活性を発揮する①に属する阻害剤である。一般にこのような阻害剤は、カイネースに対する特異性は低いといわれていることから、今回の接着の誘導もstaurosporineが未知のカイネースの活性を阻害した結果である可能性が考えられる。

Colo205細胞をTC処理 (カルシウム存在下でのトリプシン処理) するとカドヘリンの機能が回復することが明らかになった。この際のトリプシンのターゲットが如何なる分子であるかに興味をもたれるのであるが、この点については2つの可能性が考えられる。一つ目は、細胞表面上を覆いカドヘリンが結合するのを妨害するような分子が存在し、これをトリプシンが排除したためにカドヘリンが活性化された可能性である。これまでに、ある種の癌細胞では細胞表面上に大量に存在するプロテオグリカンやムコ多糖が物理的な障害物となってカドヘリンが機能するのを妨害している例が報告されている (Vleminckx et al., 1994; Kemperman et al., 1995; Kondo et al., 1998)。Colo205細胞においても、ムコ多糖の一種であるMUC1 (episilinin)を発現していることが報告された (Wesseling et al., 1996)。TC処理によってMUC1タンパク質が細胞表面から除かれていないことから、MUC1によりColo205細胞のカドヘリン活性が抑えられている可能性は低いと考えられる。しかしながら、MUC1以外の他のプロテオグリカンやムコ多糖によって同様の現象が起こっている可能性は否定できない。二つ目は、トリプシンがColo205細胞の細胞内の生理的条件に直接働きかける可能性である。トリプシンが細胞膜表面にある膜分子に作用する点の一つ目のモデルと同じであるが、この作用の結果細胞内の生理的条件、たとえばリン酸化レベルが変動し最終的にカドヘリンが活性化される可能性である。例えば、“この細胞では常に活性化されている膜貫通型プロテインカイネースなどの膜貫通型の分子が存在し、カドヘリンの機能を抑えている。しかし、トリプシンがこのカイネースを分解し不活性化すると、カドヘリンの機能が回復する”という可能性である。一般にレセプター型の膜貫通型カイネースは細胞内にリン酸化反応をつかさどる領域があり、細



胞外領域はリガンドとの相互作用に用いられる。このタイプのカイネースの多くは二量体を形成することにより活性化され、その二量体形成には細胞外領域でリガンドと相互作用することが必要である。このことから、細胞外領域が削除されたレセプター型カイネースはカイネースとして機能できないと考えられる(Schlessinger and Ullrich, 1992)。今回報告したColo205細胞において、トリプシンによりレセプター型カイネースの細胞外領域が削除され、この活性が失われた結果細胞の生理的条件が変化し、カドヘリンが活性化された可能性が十分考えられる。さらに、staurosporineはこのレセプター型カイネースからカドヘリンに至るシグナル伝達に直接影響を与えていることも考えられる(fig. 2-12)。

fig.2-12 Colo205細胞の細胞間接着の活性化の際の staurosporine、トリプシンの作用機構 通常の培養条件下では、トリプシンの標的である膜分子からシグナルが伝わり、カドヘリンは不活性化されている。トリプシンがこの分子を分解するとこのカスケードがオフになり、カドヘリンの機能が回復する。staurosporineはシグナル伝達の過程に存在するカイネースに作用するのではないか。なお、トリプシンの標的である膜分子と、staurosporineの標的であるカイネースが、同一である可能性もありうる。

2-2-2. カドヘリンによる強い接着と弱い接着

最近になりカドヘリンによる細胞接着には2つの状態があることがいくつかの論文で示唆された。Takedaらはイヌ腎臓上皮由来のMDCK細胞に温度感受性のv-src遺伝子を導入したものをを用いて、srcカイネースがカドヘリンの機能に与える影響を検討した。すると非許容温度、すなわちsrcカイネースが活性を持つ条件下でMDCK細胞の上皮様の形態が失われ、当初はカドヘリンの機能が完全に無くなったと考えられた。しかしながらこの細胞を用いて細胞集合実験を行うと、カドヘリン依存性の集合塊が形成されることが明らかになった。さらに、この集合塊は許容温度下でのコンパクトな集合塊と異なりルーズな集合塊であったことから、カドヘリンによる細胞接着には2つの段階、すなわちコンパクトな集合塊を形成するために必要な強い接着と、そうでない弱い接着があるのではないかと考えられた (Takeda et al., 1995)。

ルーズな集合塊とコンパクトな集合塊の違いはいったい何に由来するのであろうか。カドヘリンによる強い接着と弱い接着の存在を示唆する結果は、 α -カテニンを欠損する細胞を用いたWatabe-Uchidaらや、カドヘリンの細胞質領域全長を欠いた変異分子を用いたOzawaらによって報告されている(Watabe-Uchida et al., 1998; Ozawa and Kemler, 1998b)。このことから、カドヘリンと細胞骨格との相互作用が異常になると強い接着が維持できなくなると考えられる。Colo205細胞は通常の培養条件下でカドヘリン依存性の集合塊を形成するが、それはルーズな集合塊でありコンパクトな集合塊ではない。つまり弱い接着しか起こらないわけだが、この際カドヘリンとアクチンの局在が一致しないことが明らかになった。一方トリプシン処理によってコンパクトな集合塊の形成が誘導されると、カドヘリンの局在はアクチンの局在と一致した (fig.2-11)。この結果から、この細胞が強く接着できない理由のひとつはカドヘリンがアクチンと相互作用できないためであると思われる。また、未処理の細胞を界面活性剤で処理したあと固定し、E-カドヘリンを検出したところ、意外にも多くのカドヘリンが界面活性剤により抽出されずに残っていた。このことは、カドヘリンがアクチン以外の細胞骨格系と相互作用していることを強く示唆している。以上のことから、通常の培養条件下でのColo205細胞ではカドヘリ

ンがなんらかの細胞骨格系と相互作用することによりその膜上での横方向の動きが制約を受けるため、結果としてカドヘリンがアクチンと相互作用できない可能性が考えられる (fig. 2-13)。今後カドヘリンの機能を阻害するこの骨格系の正体を明らかにすることにより、未知の制御機構が明らかになることが期待される。

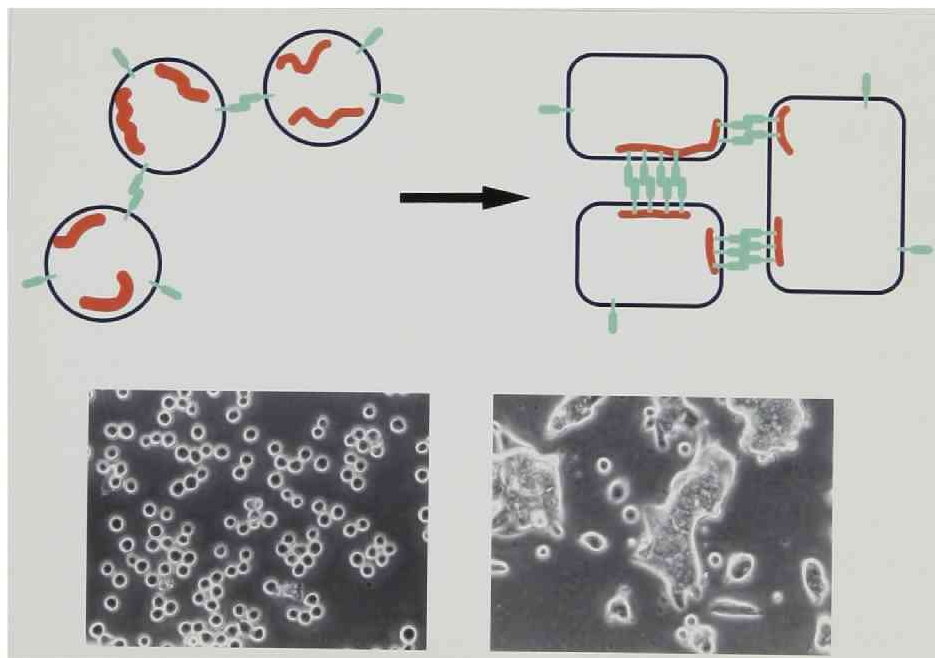


fig.2-13 カドヘリンによる強固な細胞間接着の構築

----- loose aggregate vs compact aggregate

Colo205細胞のカドヘリン（緑）は通常の培養条件下でアクチン（赤）と相互作用できないために強固な細胞接着を形成できない

2-2-3. 癌転移とカドヘリン、カテニン

浸潤および転移とは癌細胞が原発巣から遊離し血流に乗り体内の別の部位に到達しそこで新たに増殖を始めるという、悪性腫瘍に特有の現象である。この特性により悪性腫瘍の治癒率は良性腫瘍のそれに比べかなり低いため、癌転移の研究は重要なテーマになっている。最近、癌の悪性化とカドヘリンの不活性化との間に密接な関係があることが明らかにになりつつある。悪性腫瘍由来の細胞株のカドヘリン／カテニンが点突然変異により機能できない例や (Oyama et al., 1991; Shiozaki et al., 1996)、カテニンを全く発現していない例が報告されている (Shimoyama et al., 1992)。また、Matsuyoshiらの知見や今回の発見のように、細胞内でのリン酸化の上昇の結果、カドヘリンの機能が抑えられることが示唆された (Matsuyoshi et al., 1992)。逆に、カドヘリンの発現が浸潤を阻害することも *in vitro* の系ではあるが明らかにされている (Frixen et al., 1991; Vleminckx et al., 1991)。さらに最近になって β -カテニンが家族性大腸癌の原因遺伝子である APC の遺伝子産物と結合していることが明らかにになり (Rubinfeld et al., 1993; Su et al., 1993)、しかも、悪性癌腫由来の細胞株でよく認められる β -カテニンの発現量の増加が、この遺伝子産物の欠失型突然変異の結果である可能性が示唆された (Munemitsu et al., 1995)。さらに、大腸癌のみならず皮膚癌において β -カテニンの発現量が安定化するような突然変異が β -カテニン自身に起こり、癌化に関与しているという報告もある (Rubinfeld et al., 1997)。APC などの変異はまず良性腫瘍を引き起こし、そのポリープ内でさらに別の遺伝子に変異すると悪性化するといわれている (reviewed by Fearon and Vogelstein, 1990)。このことから良性腫瘍から悪性腫瘍への遷移の過程において、 β -カテニンの発現量の増加が悪性化、すなわちカドヘリンの不活性化の鍵を握っている可能性もある。

カドヘリン／カテニンの機能制御のメカニズムの理解は癌転移の現象の解明、さらには治療法の開発の礎になることが期待される。特に治療法開発の立場から見れば、今回報告した staurosporine は改良を重ね癌細胞に対する特異性を高めることができれば、近い将来たとえある種の癌にしか効果がないとしても、抗転移薬としての応用が可能であろう。逆に、悪性腫瘍由来の細胞株のカドヘリンを研究することにより未知のカドヘ

リンの制御機構が明らかになることも同時に期待される。

2-2-4. 分子レベルでの解明に向けて—第三章への導入

今回の実験によりColo205のカドヘリンを活性化する方法を2種類発見した。この系を用いて、それぞれの処理時におけるカドヘリン／カテニンの分子レベルでの変化を調べることにより、新しいカドヘリンの制御機構が明らかになることが期待される。実際、staurosporineは未知のカイネースに効いている可能性が考えられる。また、staurosporine、トリプシンと一見無関係に見える処理だが、これらが同じ経路を経てカドヘリンに作用しているのか、それともそれぞれ独立した経路を経て作用しているのかという問題は非常に興味深い。この問いに正確に答えるには、処理時に細胞内で起こっていることを分子レベルで解明することが必要である。以上の理由から、引き続いてこの接着誘導の際に、分子レベルでどのような変化が起こっているかを、特にカドヘリン／カテニン複合体に焦点を絞り追究したので、次章にその結果をまとめた。

第三章

Colo205細胞の接着の回復における カドヘリン、カテニンの変化

第三章 Colo205細胞の接着の回復における

カドヘリン、カテニンの変化

3-1. はじめに

前章でカドヘリンの制御機構の研究に適した大腸癌由来の細胞株を用いた実験系について報告した。この章では一步踏み込んで、この接着誘導時に起こっている分子レベルの変化について免疫沈降法とイムノブロット法を用いて調べた。その結果、p120について新しい機能制御機構の存在を示唆する結果を得た。なお、前章でColo205細胞の細胞間接着を誘導する方法をいくつか報告したが、もっとも短時間で効果のあるトリプシン処理(TC処理)を中心に研究をおこなった。staurosporineによる接着誘導時の変化の結果は随時確認という形で進めた。

3-2. 結果

3-2-1. 全細胞抽出物中のカドヘリン／カテニンの接着誘導前後での比較

Colo205細胞はお互いに接着していないときにもE-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニンを発現していた(fig.2-2)。しかしながら接着誘導処理によりカドヘリン依存性の接着が回復した際に、これらの発現量がさらに増加したために接着が回復した可能性が考えられた。そこで、TC処理の前後でこれら三分子とさらにもうひとつのカテニン、p120の発現量を比較した。30分のTC処理後に接着が誘導されていることを確認し、細

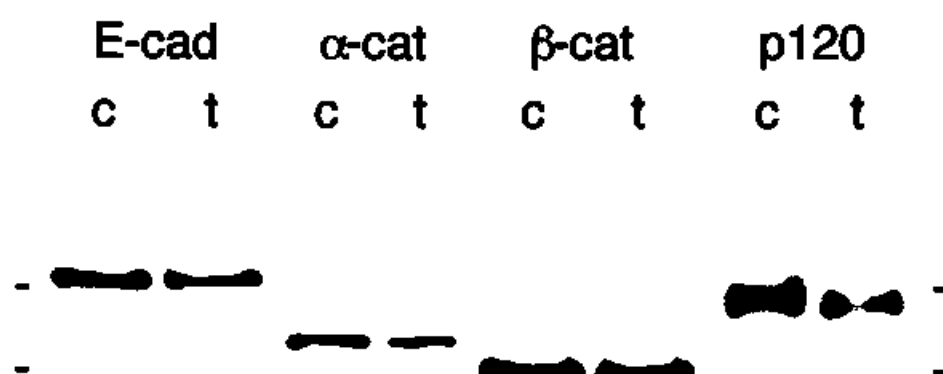


fig.3-1 全抽出物中のカドヘリン／カテニン／ p120のTC処理前後の比較

未処理のサンプル(c)と、TC処理により接着を誘導したサンプル(t)を回収し、そこに含まれるE-カドヘリン、 α -カテニン、 α -カテニン、 β -カテニン、p120の量をウエスタンブロット法で解析した。いずれも発現量の変化は認められなかった。しかし、p120については、バンドのパターンに差が検出された。p120は処理前にはおよそ二本からなる拡散したバンドが検出されたのに対し、処理後は、処理前の拡散したバンドの中でもっとも低分子量の位置に相当する位置にシグナルが濃縮した。各レーンには同じ数の細胞から得られたサンプルを泳動した。

胞を回収してイムノブロット法で各分子の発現量を解析した(fig.3-1)。するとE-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニンについては処理前後で発現量の変化やその他の違いは認められなかった。しかしp120については、発現量の変化こそなかったがバンドのパターンに差が検出された。p120は処理前にはおおむね二本からなる拡散したバンドが検出されたのに対し、処理後は、処理前の拡散したバンドの中でもっとも低分子量の位置に相当する位置にシグナルが濃縮した。

このp120で検出された変化が、staurosporineによる接着誘導の後にも起こるかを調べることは、二つの処理が同じ経路に作用しているか否かを判断するうえでよい指標になると考えられた。そこでp120に関してこの点を検討したところ、staurosporineで接着を回復させたときにも、TC処理時にみられたのと同様のバンドシフトが認められた(fig.3-2)。

p120
C S



fig.3-2 staurosporine処理の

p120に与える影響 (A) 未処理の細胞 (c) と、staurosporine処理 (7.0 nM、6時間) により接着を誘導した細胞 (s) を回収し、そこに含まれる p120 をイムノブロット法で解析した。staurosporine によって接着を誘導した際にもTC処理時にみられたのと同様のp120のバンドシフトが検出された。各レーンには同じ数の細胞から得られたサンプルを泳動してある。

Colo205細胞の細胞間接着を誘導した際に、p120 のバンドシフトと細胞間接着のいずれが先に起こっているかを検討した。TC処理の5分後、15分後、30分後に細胞を回収し、イムノブロット法によりp120 を検出した。TC処理後5分ではまだ細胞間接着は全く誘導されていないが(結果省略)、このときすでにp120 のバンドは一部が低分子量側に下シフトしていることが明らかになった。また、TC処理後15分ではまだ細胞間接着は一部の細胞でしか誘導されていないが (fig.2-9)、このときすでにp120 のバンドは完全に低分子量側に濃縮していることが明らかになった。staurosporineについても培養に添加し2時間後、4時間後、6時間後、8時間後、24時間後に細胞を回収し、イムノブロット法によりp120 を検出した。staurosporineについてもTC処理の時と同様に、まだ少数の細胞でしか細胞間接着が回復していない (図2-5A) 2時間後において、かなり高い割合のp120分子がすでに低分子量側にシフトしていることが観察された。以上の結果からp120 のバンドシフトは細胞間接着に先んじて起こっていることが示唆された。

トリプシンやstaurosporineにより細胞間接着が一旦誘導された細胞は、これらの試薬を除去しさらに培養を続けると、もとの丸い形態を再現することをすでに報告した (fig.2-6)。そこで、トリプシンにより細胞間接着を誘導した細胞をトリプシンを除いて

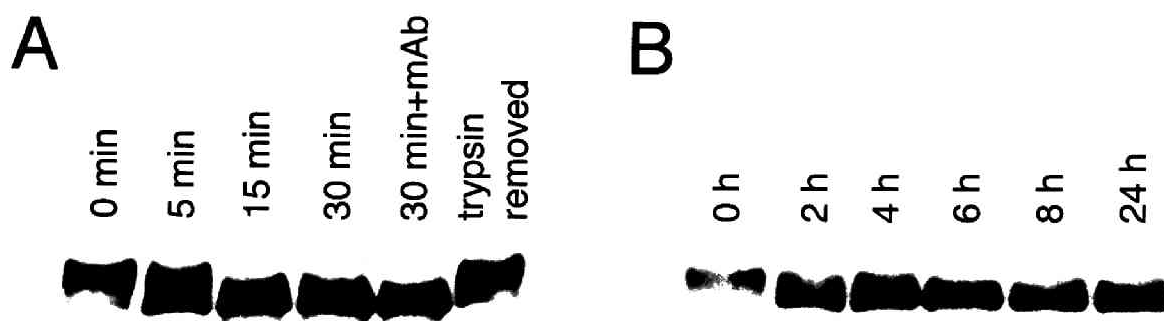


fig.3-3 トリプシン、staurosporine処理時のp120 のバンドパターンの継時的変化

化 A, 0.001% トリプシン処理; B, 7.0 nM staurosporine処理。全細胞抽出物を泳動し抗p120 抗体で検出した。+mAb; 1 μ g/ml SHE 78-7存在下でトリプシン処理を行ったサンプル。trypsin removed; 30分のトリプシン処理後トリプシンを除去しさらに18時間培養した。

さらに18時間培養し、形態が最初の丸い状態に戻ったことを確認後その細胞を回収し、p120のバンドパターンを解析した。すると、この細胞のp120のバンドパターンは最初の未処理の細胞に由来するバンドパターンと極めてよく似ていた (fig.3-3)。この結果からp120のバンドシフトと接着の誘導との関連性がより高くなった。

つぎに、接着誘導時のp120 のバンドシフトが、TC処理や staurosporine が直接p120 に作用したためにおこったのか、それともカドヘリンが機能回復したことによる二次的な結果であるかをより直接的に示すために以下の実験を行った。まず、トリプシン処理を行う際にカドヘリンの機能阻害抗体を加え接着をブロックした場合バンドシフトが検出されるかを検討した。30分のトリプシン処理に際しカドヘリンの機能阻害抗体SHE 78-7を1 μ g/mlになるように加え接着誘導を完全に阻害した。するとこのときにも、同等のp120のバンドシフトが検出された (fig.3-3)。この結果から、p120のバンドシフトは接着が回復した結果引き起こされる現象ではないことが示された。同様に、staurosporine 処理に際しカドヘリンの機能阻害抗体により接着誘導を阻害したときにも同等のバンドシフトを検出した (結果省略)。

さらに、カドヘリンを分解しないトリプシン処理 (TC処理) とカドヘリンを分解するトリプシン処理 (EGTAを加えて行うトリプシン処理; TE処理) を行い両者を比較した。TE処理によりこの細胞はトリプシンの作用を受けるがカドヘリンが同時に分解されるために細胞間接着は回復しない。このことから、TC処理時に p120 で認められた変化が、接着誘導の結果おきた現象であるかどうか明らかになるはずである。TC処理またはTE処理を行い、TE処理の場合には細胞間接着が回復していないことを確認後回収し、p120 (A) とE-カドヘリン (B) を検出した。TE処理によりE-カドヘリンはほぼすべて分解されていることが確認された(B)。一方p120のTE処理後のシグナルのパターンは TC処理後のそれに一致し、それぞれ脱リン酸化によると思われるバンドシフトが観察された (fig.3-4)。このことからTC処理の際検出された p120 の変化はカドヘリン機能回復の結果ではないことが示唆された。

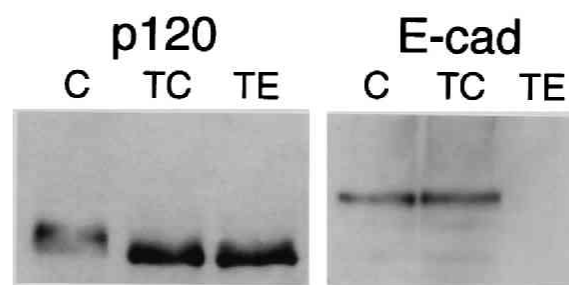


fig.3-4 TC vs TE

未処理のサンプル (c)、接着を誘導するトリプシン処理 (TC処理) したサンプル (TC)、接着を誘導しないトリプシン処理 (TE処理) したサンプル (TE) を回収し、p120 (A) とE-カドヘリン (B) を検出した。TE処理によりほとんどのE-カドヘリンは分解されていた(B)。p120はTE処理の際にTC処理時と同様のバンドシフトを検出した。各レーンには、等しい量の細胞から回収したサンプルを泳動した。

3-2-2. 抗E-カドヘリン抗体による免疫沈降実験

TC処理によるカドヘリンの機能回復にともなうカドヘリン／カテニンの発現量の変化は認められなかった。しかしカドヘリンはカテニンと結合しなければ、たとえ両者が発現していても接着分子として正常には機能できない。そこでカドヘリンとカテニンの相互作用がTC処理により変化する可能性を考え、抗E-カドヘリン抗体に対する免疫沈降を行い、共沈する分子を解析した (fig.3-5)。等しい量のE-カドヘリンと共沈する α -カテニン、 β -カテニン、p120の量をTC処理前後で比較したが、これらはいずれも同じであった。しかしながらp120については全抽出物を比較したときと同様のバンドシフトを検出した。

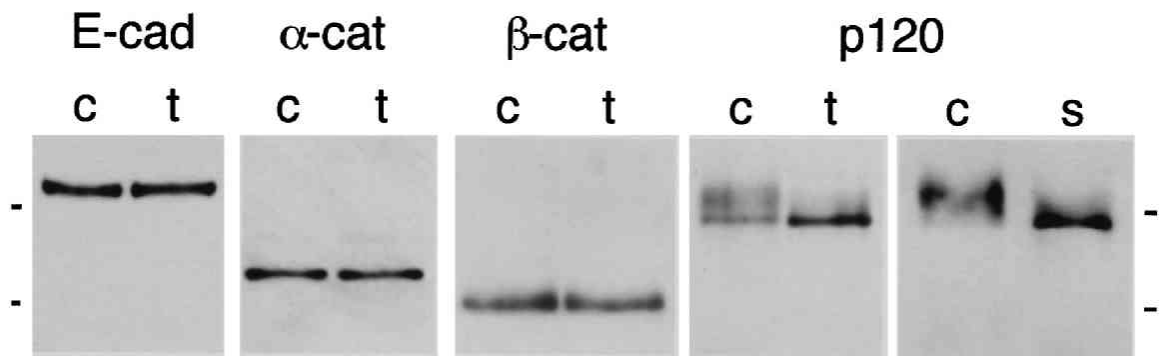


fig.3-5 抗E-カドヘリン抗体に対する免疫沈降物中のカドヘリン／カテニン／p120の比較 未処理の細胞 (c) と、TC処理により接着を誘導した細胞 (t) から、抗E-カドヘリン抗体に対する免疫沈降をおこない、そこに含まれるE-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニン、p120を比較した。p120についてはstaurosporineにより接着を誘導した細胞 (s) についても同様の解析をおこなった。p120について fig.3-1,2と同様のバンドのシフトが検出された。各レーンには、E-カドヘリンの量が等しくなるようにサンプルを泳動した。

3-2-3. p120のバンドシフトの原因の解析

p120 について接着の誘導の前後でシグナルのパターンに差が認められた。イムノブロット法による解析でこのようなバンドパターンの変化が検出された場合、その原因がタンパク質の翻訳後修飾、特にリン酸化によることがこれまでに数多く知られている。そこでこの差が p120 のリン酸化の変化の結果であるかどうかを検討した。この p120 の α バンドシフトがリン酸化の変化の結果生じたものであるならば、接着が誘導されていない Colo205細胞から精製した p120 タンパク質を脱リン酸化酵素と反応させた際に、TC 処理したときと同様のバンドシフトが認められるはずである。そこで、TC 処理前の細胞から p120 を免疫沈降により回収しこのサンプルを引き続いて牛腸由来脱リン酸化酵素 (calf intestine phosphatase; CIP) と反応させた。すると処理前には存在した上の位置のバンドが、脱リン酸化酵素処理により消失した (fig.3-6)。このことから接着の回復に伴う p120 のバンドのパターンの変化は p120 の脱リン酸化の結果であることが示唆された。

Colo205細胞ではカドヘリンが機能できないときに p120 がリン酸化されていることが示唆されたので、次にホスホアミノ酸分析により Colo205細胞の p120 がリン酸化を受けているアミノ酸残基の特定を行った。 ^{32}P 存在下で 24 時間培養した細胞から免疫沈降法により p120 を回収した。比較のために同時に TC 処理した細胞からも p120 を回収した。回収したこれらのサンプルを SDS-PAGE で分離しオートラジオグラフィ解析したところ、興味深いことに未処理の細胞から回収した p120 のみならず、TC 処理を施した細胞から回収した p120 から ^{32}P のラベルが検出された (fig.3-7A)。引き続き、ゲルから p120 タンパク質を切り出しホスホアミノ酸分析をおこなったところ、TC 処理前後の両サンプルからホスホセリンの位置に ^{32}P のラベルが検出された (fig.3-7B)。

fig.3-6 p120のリン酸化の検討 (1)

ー脱リン酸化酵素処理による解析

未処理のサンプル から p120 を免疫沈降法により回収し、脱リン酸化酵素処理したもの (+) と、しなかったもの (-) とを、抗 p120 抗体で検出した。脱リン酸化酵素処理により接着誘導処理時にみられたのと同様のバンドシフトが認められた。それぞれの免疫沈降物は同数の細胞から回収した。右の二つは比較のために泳動したTC処理、staurosporine処理した細胞のサンプルである。

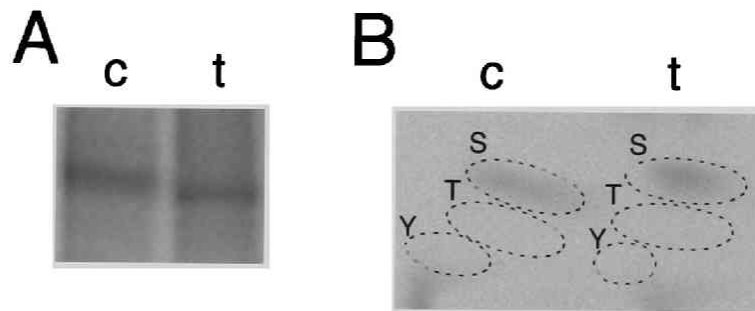
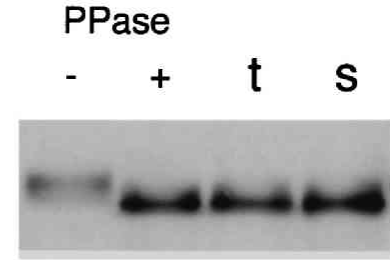


fig.3-7 p120のリン酸化の検討 (2)ーホスホアミノ酸分析による解析

(A) ^{32}P 存在下で24時間培養した細胞から免疫沈降法によりp120を回収した。比較のために同時にTC処理した細胞からもp120を回収した。回収したこれらのサンプルをSDS-PAGEで分離しオートラジオグラフィー解析した。未処理の細胞から回収したp120のみならず、TC処理を施した細胞から回収したp120からも ^{32}P のラベルが検出された。(B) (A)のゲルからp120タンパク質を切り出しホスホアミノ酸分析をおこなった。TC処理前後の両サンプルからホスホセリンの位置に ^{32}P のラベルが検出された。S, ホスホセリン; T, ホスホスレオニン; Y, ホスホチロシン。

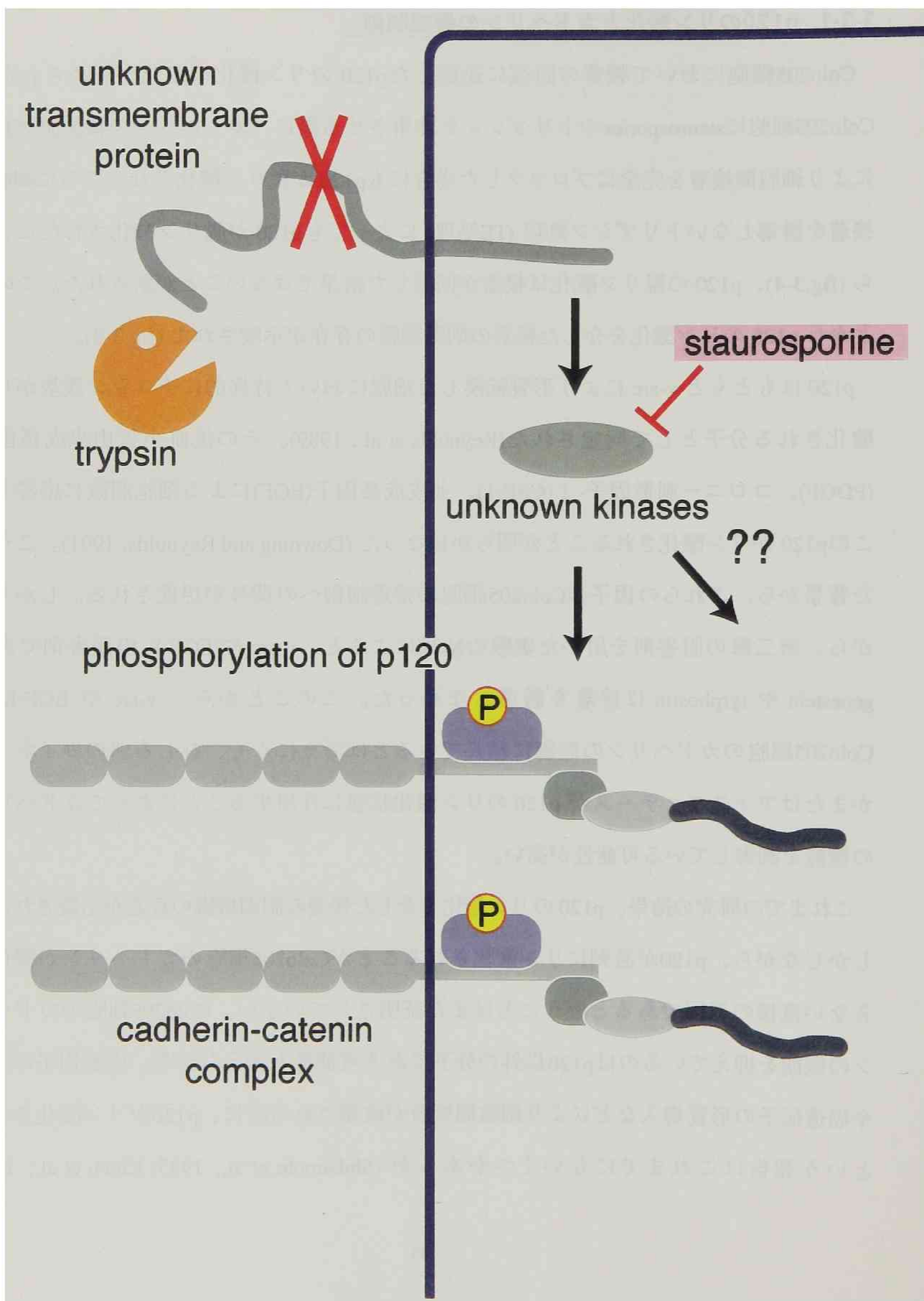
3-3. 考察

3-3-1. p120のリン酸化とカドヘリンの機能制御

Colo205細胞において接着の回復に連動したp120のリン酸化の変化が認められた。Colo205細胞にstaurosporineやトリプシンを作用させる際に、カドヘリンの機能阻害抗体により細胞間接着を完全にブロックした場合にもp120が脱リン酸化され、さらに細胞間接着を誘導しないトリプシン処理(TE処理)によってもp120が脱リン酸化されたことから(fig.3-4)、p120の脱リン酸化は接着が回復した結果ではないことが示された。このことからp120のリン酸化を介した接着の制御機構の存在が示唆された(fig.3-8)。

p120はもともとv-srcにより形質転換した細胞において特異的にチロシン残基がリン酸化される分子として同定された(Reynolds et al., 1989)。その後血小板由来成長因子(PDGF)、コロニー刺激因子-1(CSF-1)、上皮成長因子(EGF)による細胞刺激にตอบสนองしてこのp120がリン酸化されることが明らかになった(Downing and Reynolds, 1991)。こうした背景から、これらの因子のColo205細胞の接着制御への関与が想像される。しかしながら、第二章の阻害剤を用いた実験の結果によると、v-srcやEGF-Rの阻害剤であるgenesteinやtyrphostinは接着を誘導しなかった。このことから、v-srcやEGF-RがColo205細胞のカドヘリンの制御に絡んでいるとは考えにくく、むしろ別のカイネースかまたはフォスファターズがp120のリン酸化状態に作用することによってカドヘリンの機能を制御している可能性が高い。

これまでの研究の結果、p120のリン酸化を介した接着の制御機構の存在が示唆された。しかしながら、p120が過剰にリン酸化されることがColo205細胞のカドヘリンが機能できない直接の原因であるということはまだ証明されていない。Colo205細胞のカドヘリンの機能を抑えているのはp120以外の分子である可能性も考えられる。成長因子の投与や癌遺伝子の形質導入などにより細胞間接着が破壊される際に、p120がリン酸化されるという報告はこれまでもいくつかあるが(Shibamoto et al., 1995; Kinch et al., 1995;



Skoudy et al., 1996; Lampugnani et al., 1997; Ratcliffe et al., 1997; Rosato et al., 1998)、いずれも二つの現象の相関を見たに過ぎずp120の機能は依然不明のままである。この問題を解決するために、p120の機能をより直接的に探るための実験を行う必要性がある。

第四章では引き続いてp120の脱リン酸化とカドヘリンの活性化との因果関係をより直接的に明らかにする目的で、p120 及びカドヘリンの変異分子を作製しColo205細胞の導入する実験を行った。これらの実験を通して、p120はカドヘリンの活性を負に制御するまったく新しいタイプのカドヘリン結合分子であることが本研究によりはじめて示されたのでその結果を報告する。

fig.3-8 (左ページ)トリブシン、staurosporineはp120を介してカドヘリンに作用するのではないか? 通常の培養条件下では、トリブシンの標的である膜分子から p120 にシグナルが伝わり、これらがリン酸化されるために、カドヘリンは不活性化されている。トリブシンがこの分子を分解するとこのカスケードがオフになり、p120が脱リン酸化され、カドヘリンの機能が回復する。staurosporineはシグナル伝達の過程に存在するカイネースに作用する。ただし、p120以外にトリブシン、staurosporineの真のターゲットが存在する可能性もある。

第四章

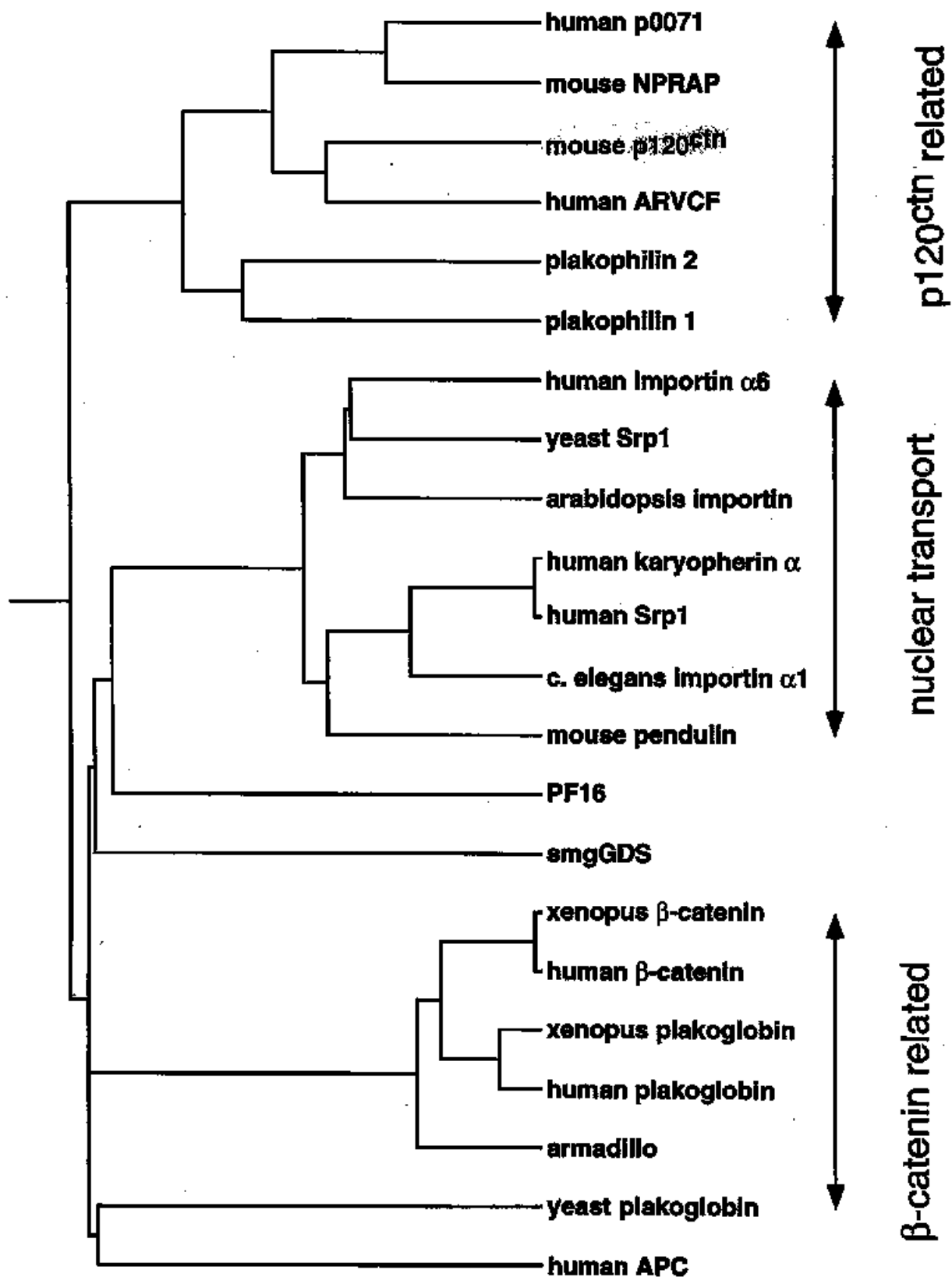
p120 の機能解析

第四章 p120 の機能解析

4-1. はじめに

4-1-1. アルマジロリピート

armadillo 遺伝子はショウジョウバエの初期胚において一節内の前後の極性が乱れる変異体の原因遺伝子として単離された (Riggelman et al., 1989)。その遺伝子産物の特徴としては、中央に42-45アミノ酸からなる不完全な繰り返し構造を持つ。その後、この繰り返し構造 (アルマジロリピート) を持つタンパク質が相次いで同定された。その中には *armadillo* の脊椎動物ホモログであり、カドヘリンの細胞質領域に相互作用する分子として同定された β -カテニンが含まれていた。興味深いことに、 β -カテニンやアルマジロタンパク質はこのリピートモチーフの部分でカドヘリンの相互作用していることが明らかになった。近年、このアルマジロリピートはガン抑制遺伝子の APC (adenomatous polyposis coli) や核内輸送にかかわる importin などにも含まれていることが明らかになり、そのいずれにおいてもこのモチーフがタンパク質間の相互作用に重要な役割を担っていることが示された (Daniel, 1997; Hatzfeld, 1999)。さらに、このモチーフを持つ分子は *Yeast* や *Chlamydomonas* でも見つかっている。これらのことから、このアルマジロリピートは単細胞生物から高等脊椎動物にわたって広く保存されていて、タンパク質間相互作用に用いられていると考えられる。



From M. Hatzfeld, 1999 *International Review of Cytology*, Vol. 186: 179-224

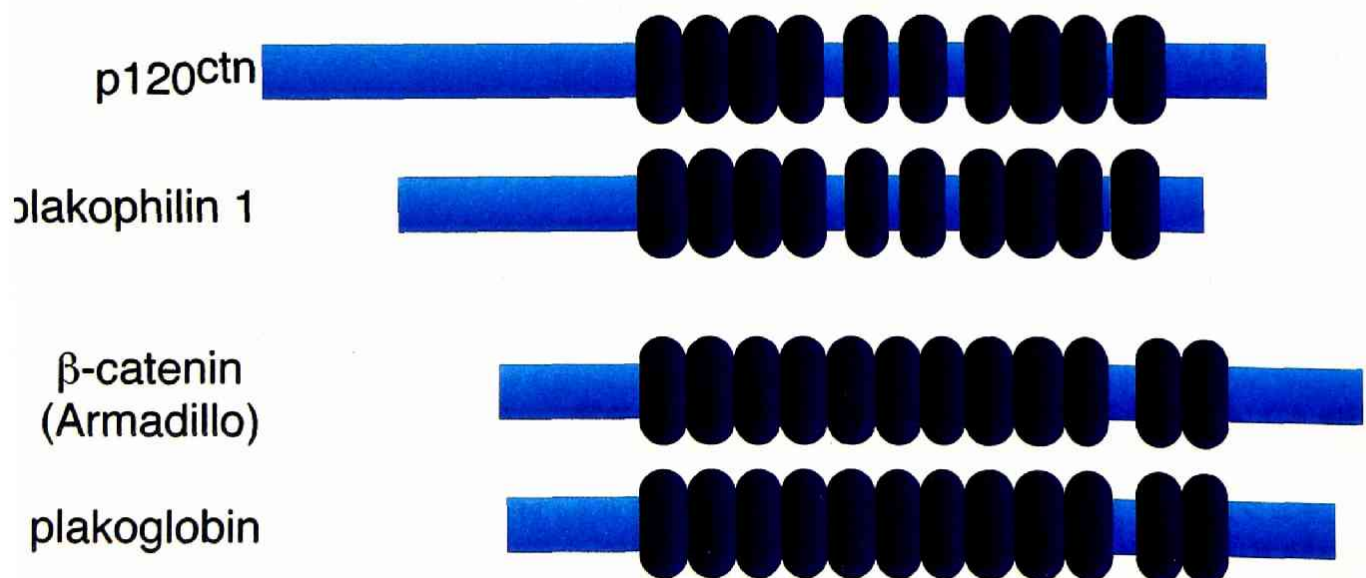
4-1-2. p120 の由来、p120 とは

p120はv-srcを導入することにより形質転換したニワトリの初代培養細胞において、チロシン残基がリン酸化される分子量が120kDaの分子として同定された (Reynolds et al., 1989)。その後血小板由来成長因子(PDGF)、コロニー刺激因子-1 (CSF-1)、上皮成長因子(EGF)による細胞刺激に応答してこのp120 がリン酸化されることが明らかになった (Downing and Reynolds, 1991)。さらに、p120 が β -カテニンなどに見られる前出のアルマジロリピートモチーフを持つことから (Reynolds et al., 1992)、カドヘリンとの相互作用が検討された結果、複数のグループによりカドヘリンと相互作用が明らかにされた (Reynolds et al., 1994; Shibamoto et al., 1995; Staddon et al., 1995; Aghib and McCrea, 1995)。最近になり、p120が相互作用するカドヘリンの細胞内領域が複数のグループから報告された。p120 と β -カテニンはいずれもアルマジロリピート領域でカドヘリンと相互作用するにもかかわらず、興味深いことに、p120 は β -カテニンが結合する部位よりも、より細胞膜側の領域でカドヘリンと相互作用することが明らかになった (Lampugnani et al., 1997; Finnemann et al., 1998; Yap et al., 1998; 本編fig.4-18、65ページ)。 β -カテニンの重要な機能のひとつとして、カドヘリンと α -カテニンとの間をつなぐ働きがある (本編fig.1-3、10ページ)。そこで、p120 について同等の働きがあるかが検討されたが、Two-Hybrid法による解析の結果、p120 と α -カテニンとは相互作用しないことが明らかになった。これらのことから、p120 は β -カテニンとは異なった機能を持っていることが期待された。

fig.4-1 (左ページ)アルマジロリピートを持つ分子群 (Hatzfeld, 1999 を改変)

アルマジロファミリーはp120サブファミリー、インポーティン/カリオフィリンサブファミリー、 β -カテニン/アルマジロサブファミリーの大きく3つにわけられる。PF16は*Chlamydomonas*の微小管結合タンパク質、APCはヒトの癌抑制遺伝子である。

Armadillo Family



4-1-3. p120サブファミリー

近年、p120の類似分子が相次いで同定された。これらの分子は10個のアルマジロリピートを持つのが特徴である。さらに、その他の一次構造に比較から β -カテニン／アルマジロからは独立したサブファミリーを形成していることが明らかになるとともに、 β -カテニン／アルマジロとは別の機能を持つと考えられた。プラコフィリンはデスモソームに存在する分子で、そこに含まれる接着分子デスモグレインとそのアルマジロリピート領域で相互作用する (Heid et al., 1994; Mertens et al., 1996; Hatzfeld, 1997)。また、プラコフィリン-1はin vitroでケラチンとも相互作用することから、この分子は接着分子と細胞骨格をリンクさせる重要な分子であると考えられている (Hatzfeld et al., 1994)。NPRAP (neural plakophilin-related arm-repeat protein) とp0071はともにESTデータベースを検索した中で見つかった分子である (Paffenholz and Franke, 1997; Hatzfeld and Nachtsheim, 1996)。ともに細胞間境界に局在することが明らかになっているが、どのような分子と物理的に相互作用しているかはわかっていない。 δ -カテニンはもともとプレセニリン-1の細胞質領域と相互作用する分子として同定された (Zhou et al., 1997)。一次構造の比較から前出のNPRAPのマウスホモログであると考えられている。 δ -カテニンについてはカドヘリンと相互作用することがすでに確認されている (Lu et al., 1999)。ARVCF (armadillo repeat gene deleted in VCFS) はヒトの遺伝病、Velo-cardio-facial syndrome (VCFS) の家系で欠損している染色体領域に含まれる遺伝子の一つとして同定された (Sirotkin et al., 1997)。しかしながら、この遺伝子がVCFSの原因遺伝子であるかは依然不明である。p120を含むこれらの分子は、神経組織特異的なNPRAPを除き生体内のほぼすべての組織で発現が認められている。

fig.4-2 (左ページ) p120の構造

p120とプラコフィリン1、 β -カテニン、ブラコグロビンの構造を比較した。p120とプラコフィリン1はその中央部分に10個のアルマジロリピートを有する (β -カテニン、ブラコグロビンは12個)。 β -カテニン (Armادillo) とブラコグロビンは全長にわたり相同性が高いのに対して、p120とはリピート部分以外はあまり似ていない。

4-1-4. p120 とカドヘリンの機能制御

p120がカドヘリンと相互作用することが報告されたのち、p120の機能を示唆するいくつかの報告がなされた。Shibamotoらは肝成長因子 (HGF) を上皮癌細胞に投与し、細胞を分散させたときにp120がリン酸化されることを明らかにした (Shibamoto et al., 1995)。また、活性化型rasにより形質転換した細胞において細胞間接着が異常になった際、p120がリン酸化された (Kinch et al., 1995)。さらに、非膜貫通型レセプターチロシンカイネーシスのFerを強制発現させた細胞では細胞間接着が破壊されるが、その際にp120がリン酸化されることが判明した (Rosato et al., 1998)。この他にもp120のリン酸化とカドヘリンの不活性化の関連を示唆する報告が数多くあり (Skoudy et al., 1996; Lampugnani et al., 1997)、これらの結果からカドヘリンの機能制御因子としてp120が機能しているのではないかと考えられるようになった。しかしながら、これまでになされた研究はいずれも細胞間接着が異常になるのと平行してp120がリン酸化／脱リン酸化されることを示したにとどまり、p120がその直接の原因であることは明らかにされていない。今回、第二章、第三章で示したColo205細胞の系を用いることにより、p120の機能をより直接的に示すことを目指し研究をすすめた。

4-2. 結果

4-2-1. p120 のN末欠失分子の作成

Colo205細胞では、カドヘリンが機能できない状態の時にp120がリン酸化されていて、staurosporineやTC処理によってカドヘリンが活性化されると、p120が一部脱リン酸化された。このことから、Colo205細胞では通常の培養条件下ではp120がリン酸化されているためにE-カドヘリンが正常に機能できないが、staurosporineやTC処理によってp120が脱リン酸化されるとカドヘリンによる細胞間接着が回復する可能性が考えられた。しかし、staurosporineやTC処理による接着誘導に関与する重要な分子は実はp120ではなく他にあって、p120はたまたま接着誘導に前後して脱リン酸化されているに過ぎない可能性も残されていた。

Colo205細胞の接着の活性化とp120の脱リン酸化の関連性をより直接的に調べるために、以下のような実験を考案した。過剰にリン酸化されたp120がカドヘリンの活性を抑えるならば、その活性抑制に必要な領域がp120タンパク質の内部に存在するはずである。その活性抑制に必要な領域を削除した分子を作製し、Colo205細胞に導入する。このとき、外から導入した変異p120分子の活性が内在のp120分子の活性に対して優位であれば、Colo205細胞のカドヘリン活性が回復するはずである (fig.4-3)。これまでの知見から、p120は中央のアルマジロリビート領域でカドヘリンと相互作用していることが明らかになっていた (Daniel and Reynolds, 1995)。そこで、ここの部分を残しそのアミノ末端側を欠く分子とカルボキシル末端側を欠く分子をまず作製し (fig.4-4)、Colo205細胞に導入した。なお、ここで用いた改変分子はすべてそのカルボキシル末端にFLAG tagを付加し、検出する際に内在のp120と区別できるようにした。

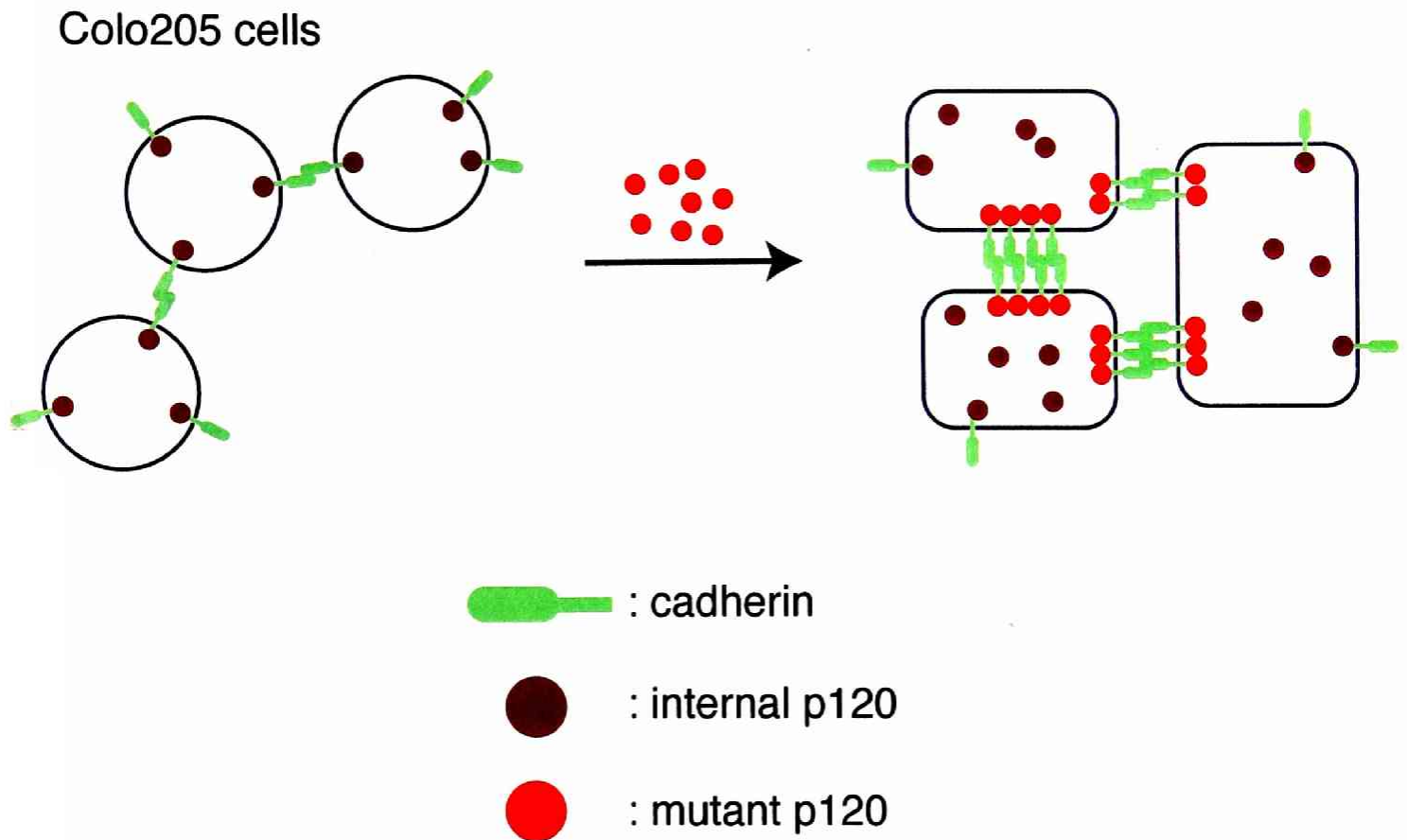
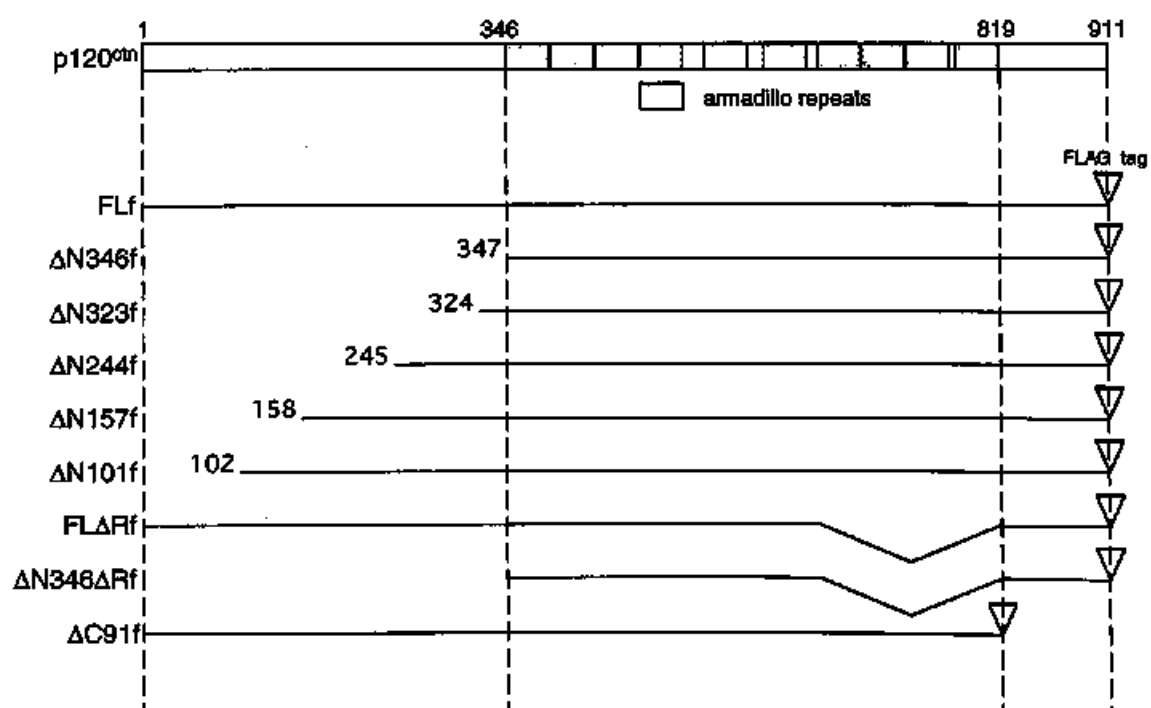


fig.4-3 Colo205細胞へのp120の変異分子の導入

p120のカドヘリンの活性抑制に必要な領域を削除した分子を作製し、Colo205細胞に導入する。このとき、外から導入した変異p120分子の活性が内在のp120分子の活性に対して優位であれば、Colo205細胞のカドヘリン活性が回復するはずである。



4-2-2. p120 のN末欠失分子を Colo205 細胞へ導入したときの効果

中央のアルマジロリピート領域を残しそのアミノ末端側すべて欠く分子 $\Delta N346f$ と、カルボキシル末端側すべてを欠く分子 $\Delta C91f$ 、そしてコントロールとして全長のp120分子FLfをColo205細胞に導入した。形質導入後72時間培養しFLAG tagに対する抗体で細胞を染色した。すると、 $\Delta N346f$ を発現している細胞のクラスターにおいてstaurosporineやTC処理時に見られたように細胞間接着が誘導された (fig.4-5)。この $\Delta N346f$ によって誘導される接着はE-カドヘリンの機能阻害抗体の存在下では観察されなかったことから、E-カドヘリン依存的事であることが明らかになった (fig.4-6)。接着が回復している細胞塊のなかで $\Delta N346f$ は細胞間接着部位に濃縮して局在し、隣接する細胞と接していない面にはほとんどその局在は認められなかった (fig.4-5)。これはstaurosporineやTC処理により接着を誘導した細胞におけるp120の局在とよく似ていた (fig.2-10; 本編 25ページ)。一方、FLfは内在のp120と同じ様に (fig.2-10) 細胞膜にそって一様に局在した。また、FLfを発現している細胞は周りのFLfを発現していない細胞と全く同じような丸い形態を示した (fig.4-5)。この結果から、p120の突然変異による機能不全によりColo205細胞のカドヘリンが正常に機能できない可能性は否定された。 $\Delta C91f$ を発現している細胞はFLfを発現している細胞や何も発現していない細胞と全く同じような丸い形態を示した。ただし、 $\Delta C91f$ は $\Delta N346f$ やFLfの様な細胞膜にそって局在を示さず、この結果から、 $\Delta C91f$ は内在のp120分子に比べカドヘリンと相互作用する能力が低いと考えられる。ゆえに、 $\Delta C91f$ にColo205細胞のカドヘリンの機能を活性化する働きがあるかについては、更なる実験の追加が必要であると思われる。

fig.4-4 (左ページ) 本研究で用いた p120の変異分子

すべての分子はC末端側にFLAG tagを付加した。PCRに用いたプライマーのおおよその位置を図の中に示した。

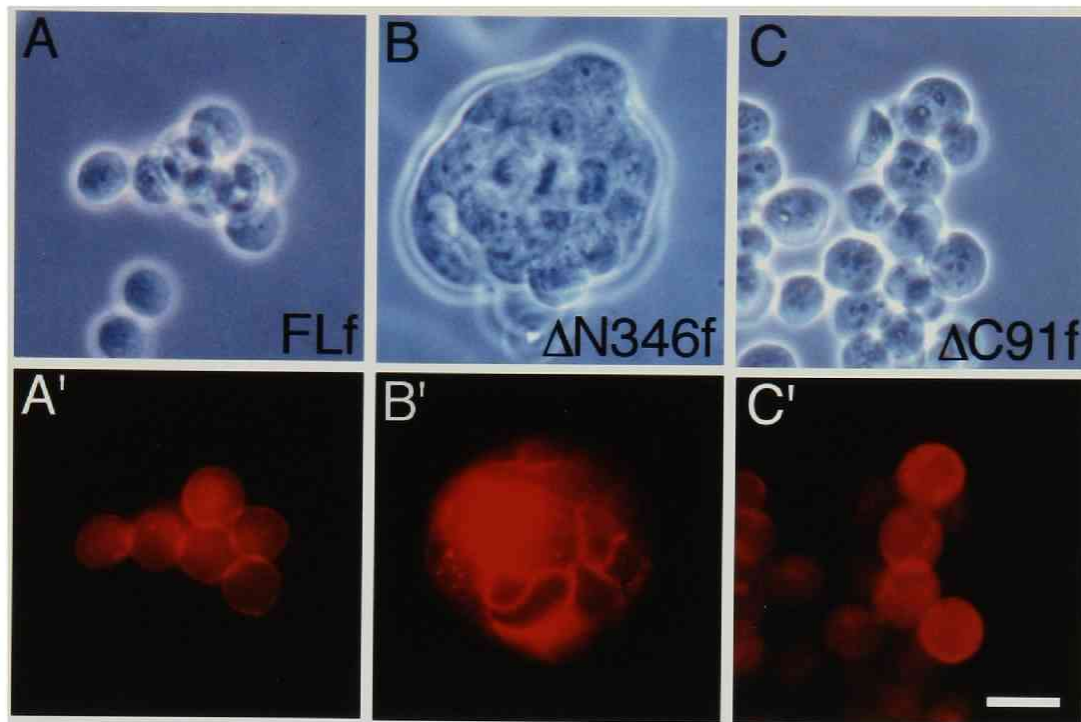


fig.4-5 p120変異分子が Colo205細胞の細胞間接着に与える影響 (1)

FLf、 $\Delta N346f$ 、 $\Delta C91f$ を Colo205細胞に導入後72時間培養し、抗FLAG抗体を用いて導入された分子を検出した。A, FLf; B, $\Delta N346f$; C, $\Delta C91f$ 。A, B, C は蛍光染色像。A', B', C' はそれぞれ A, B, C の同一視野の位相差顕微鏡像。 $\Delta N346f$ を発現している細胞において細胞間接着が誘導された。Bar, 20 μm 。

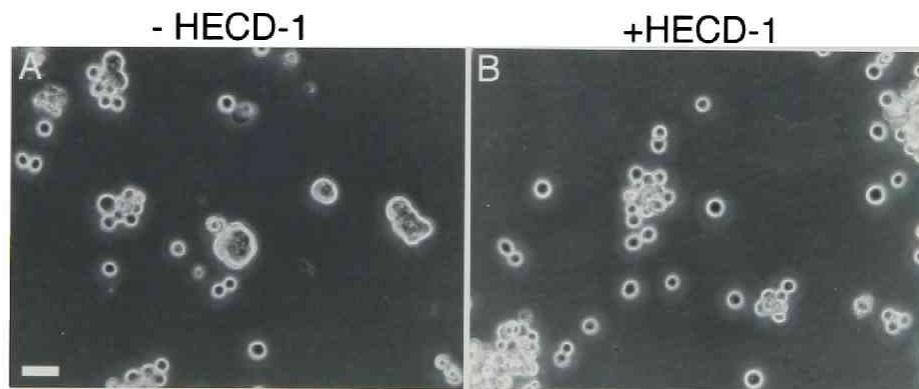
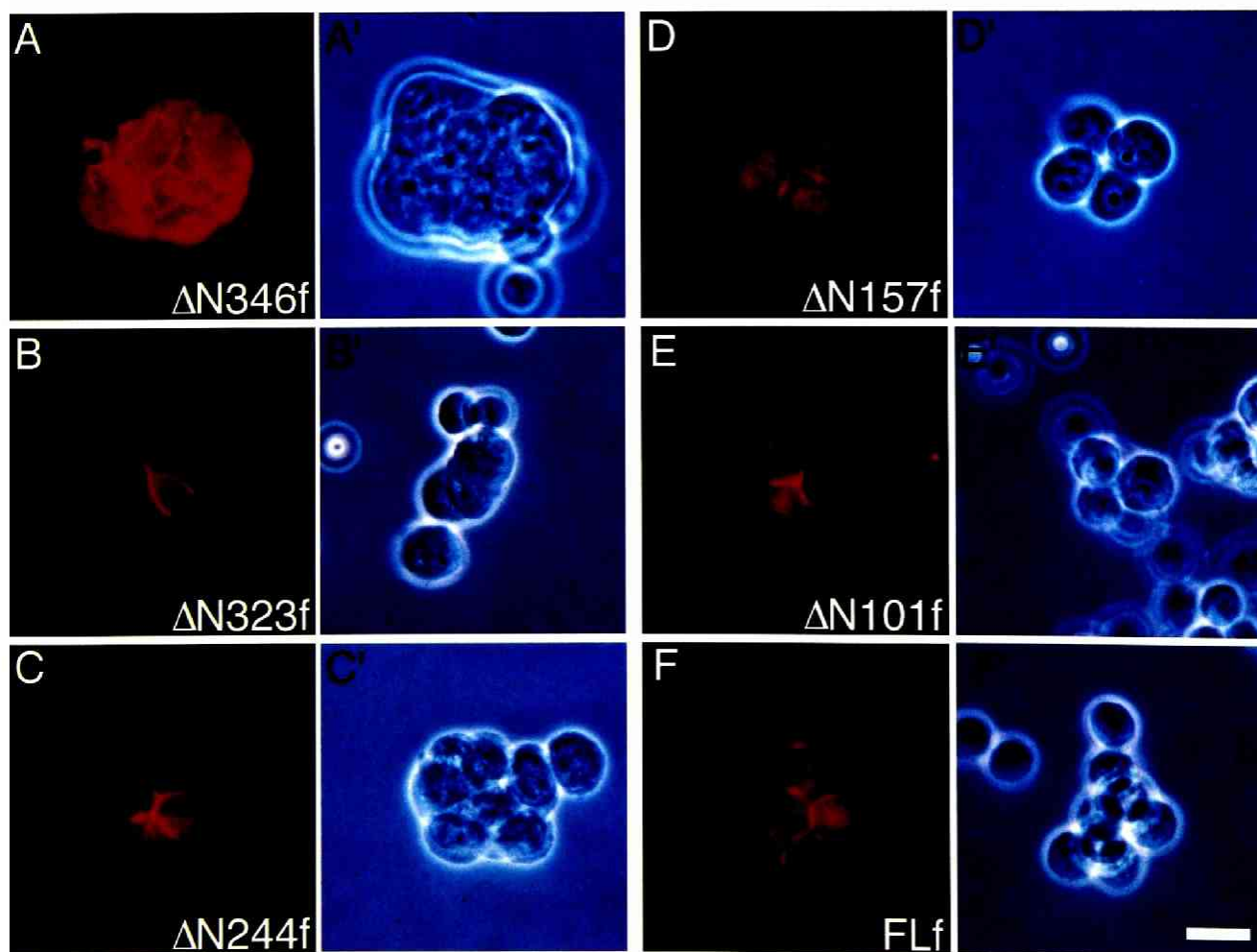


fig.4-6 $\Delta N346f$ が誘導する細胞間接着は E-カドヘリンに依存する

$\Delta N346f$ をアデノウイルスを用いてColo205細胞に導入した細胞をカドヘリンの機能阻害抗体の存在下で48時間培養した。 $\Delta N346f$ によって誘導される接着はこの抗体の存在下では観察されなかった。Bar, 20 μm 。

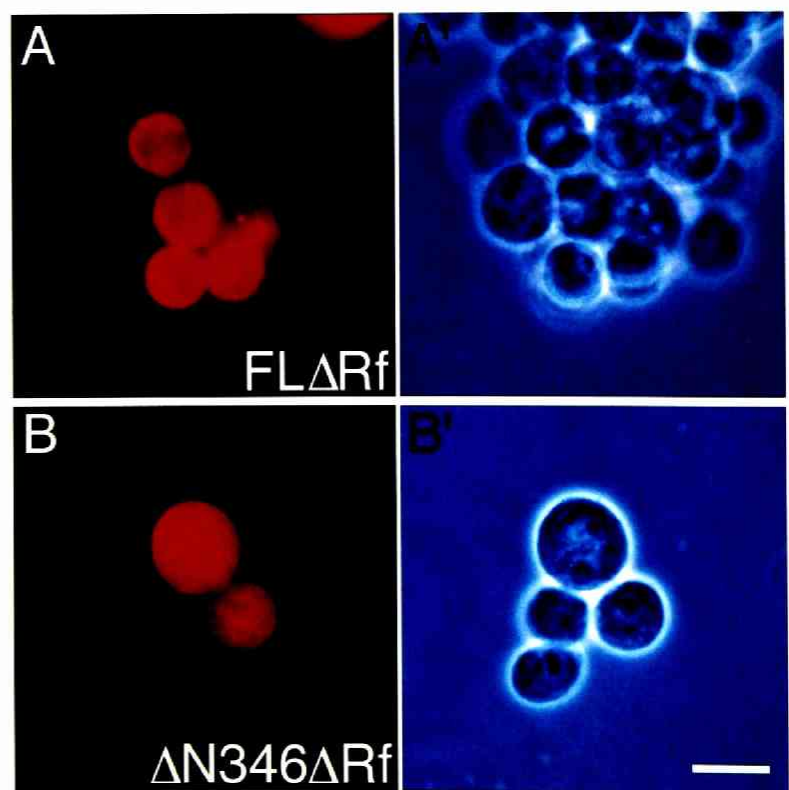


4-2-3. p120 のN末領域の解析

ΔN346fがColo205細胞の細胞間接着を誘導したことにより、ΔN346fで削除した346アミノ酸の中にColo205細胞においてカドヘリンの機能を抑制する領域があることが示唆された。そこで次に、この領域の中でどこが重要かを明らかにするために、さらにいくつかのアミノ末端側を欠く分子、ΔN101f、ΔN157f、ΔN244f、ΔN323fを作製した。これらは順にアミノ末端側101、157、244、323アミノ酸を欠く分子である (fig.4-4)。これらの変異p120分子をColo205細胞に導入し72時間後に観察した。すると、ΔN101f、ΔN157fを発現している細胞のクラスターには、FLfの時と同じように特筆すべき形態の変化は認められなかった (fig.4-7D, E)。一方、ΔN323fが導入された細胞のクラスターではΔN346fの際に見られたように細胞間接着が誘導された (fig.4-7B)。ΔN244fを発現している細胞でも細胞間接着の誘導が認められた。しかし、接着が誘導された細胞塊を明視野で観察したときにΔN346fやΔN323fの場合、個々の細胞の輪郭が区別できないのに対し、ΔN244fを発現している細胞塊では個々の細胞のかたちが判別できた (fig.4-7C)。この結果から、ΔN244fの接着を誘導する活性はΔN346fやΔN323fに比べると弱いものと想像される。

fig.4-7 (左ページ) p120変異分子が Colo205細胞の細胞間接着に与える影響 (2)

ΔN101f、ΔN157f、ΔN244f、ΔN323fをColo205細胞に導入後72時間培養し、抗FLAG抗体を用いて導入された分子を検出した。A, ΔN346f; B, ΔN323f; C, ΔN244f; D, ΔN157f; E, ΔN101f; F, FLf。A - F は蛍光染色像。A' - F' はそれぞれ A - F の同一視野の位相差顕微鏡像。ΔN323fを発現している細胞において細胞間接着が誘導された。一方、ΔN101f、ΔN157fは細胞間接着を誘導しなかった。ΔN244fは弱いながらも接着を誘導した。Bar, 20 μm。



細胞内に存在するp120分子のうちカドヘリンと相互作用しているのは全体の20%に過ぎないという報告がある(Shibamoto et al., 1995)。このことから、カドヘリンと相互作用していないp120に重要な機能があり、前節の実験で接着を誘導した変異分子もカドヘリンと独立に機能している可能性が考えられた。そこで、 $\Delta N346f$ からさらにカドヘリンとの相互作用に必須であることが明らかになっている(Daniel and Reynolds, 1995)、7-10番目のアルマジロリピートを除いた変異分子 $\Delta N346\Delta Rf$ と、FLfから7-10番目のアルマジロリピートを削った分子 FL ΔRf を作製した (fig.4-4)。形質導入後72時間培養し、FLAG tag に対する抗体で細胞を染色した。すると、 $\Delta N346\Delta Rf$ と FL ΔRf は細胞膜にそった局在は示さず、細胞質に分布した。このことから、これらの分子はカドヘリンと相互作用できないことが示唆された (fig.4-8)。さらに、 $\Delta N346\Delta Rf$ は細胞間接着を誘導できないことが明らかになった (fig.4-8B)。以上の結果から、 $\Delta N346f$ (恐らく $\Delta N323f$ 、 $\Delta N244f$ についても同様であると思われる) が細胞間接着を誘導するためにはカドヘリンと相互作用することが必要であることが示唆された。

fig.4-8 p120変異分子が Colo205細胞の細胞間接着に与える影響 (3)

FL ΔRf 、 $\Delta N346\Delta Rf$ を Colo205細胞に導入後72時間培養し、抗FLAG抗体を用いて導入された分子を検出した。A, FL ΔRf ; B, $\Delta N346\Delta Rf$ 。A, Bは蛍光染色像。A', B'はそれぞれ A, Bの同一視野の位相差顕微鏡像。FL ΔRf 、 $\Delta N346\Delta Rf$ ともに細胞質に分布した。また、 $\Delta N346\Delta Rf$ を発現している細胞において、細胞間接着は誘導されなかった。Bar, 20 μm 。

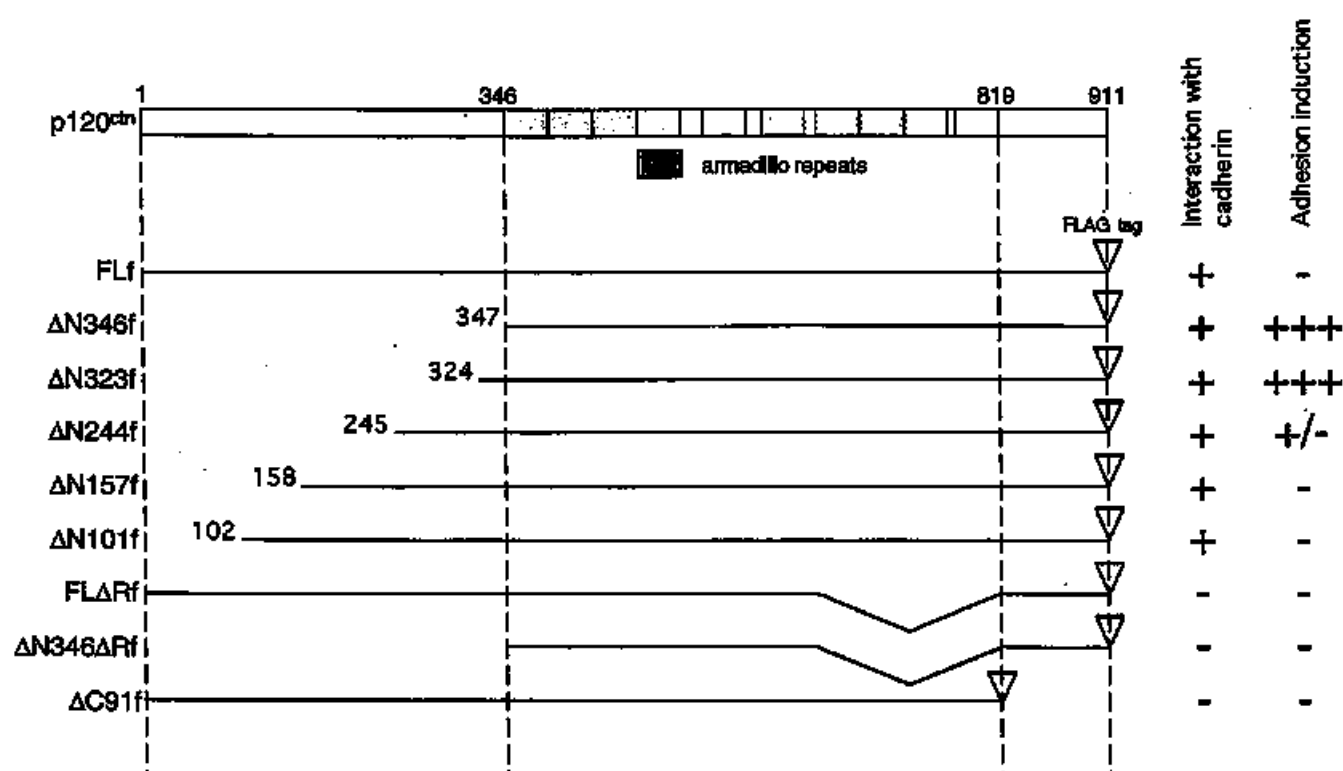


fig.4-9 p120変異分子が Colo205細胞の細胞間接着に与える影響 (まとめ)

4-2-4. p120 のN末欠失分子のリン酸化

Colo205細胞にp120の部分欠失分子を導入することによって細胞間接着が回復したことから、この細胞ではp120が直接カドヘリンの活性制御に関与していることが明らかになった。Colo205細胞ではカドヘリンが機能できないときにp120がリン酸化されている。そこで次に、p120のリン酸化とカドヘリンの活性抑制に関連性があるかを検討した。前出のFLf、ΔN101f、ΔN157f、ΔN244f、ΔN346fをColo205細胞に発現させイムノプロット法で解析した。イムノプロット法で検出できる量のタンパク質をColo205細胞に発現させるために、アデノウイルスを用いた発現系により改変分子を導入した。ウイルスを感染させ48時間培養後、細胞の全タンパク質を回収し抗FLAG抗体でイムノプロットを行った。すると、いずれの改変分子も複数のバンドとして検出された (fig.4-10)。ただし、そ

のパターンには興味深い違いが認められた。変異分子を作製する際に削除された領域が大きくなるにしたがって、複数のバンドの中でもっとも電気泳動度が高い低分子量側のバンドの割合が若干ではあるが高くなった (fig.4-10)。

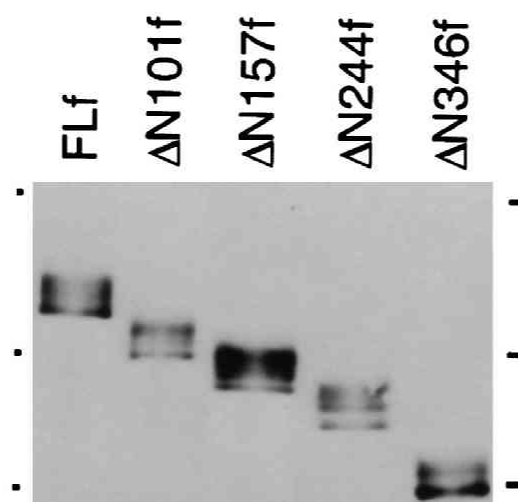


fig.4-10 Colo205細胞に発現させたp120 のN末端欠失分子のイムノプロット解析

析 FLf、 $\Delta N101f$ 、 $\Delta N157f$ 、 $\Delta N244f$ 、 $\Delta N346f$ をアデノウイルスを用いてColo205細胞に導入した。この細胞を48時間培養後回収し、抗FLAG抗体によるイムノプロット法で解析した。いずれの改変分子も複数のバンドとして検出された。分子量マーカーは上から、 175×10^3 、 83×10^3 、 62×10^3 。

4-2-5. 変異p120 とカドヘリン/カテニンの相互作用

FLfおよびΔN346fがカドヘリンと相互作用しているかをより直接的に調べるために、免疫沈降法を用いて解析した。FLfおよびΔN346fのウイルスを感染させてから48時間培養したColo205細胞から、カドヘリンに対する抗体を用いてカドヘリンと相互作用しているタンパク質を回収し、イムノブロット法によりカドヘリンと相互作用する改変p120分子の量を比較した (fig.4-12)。カドヘリンの量をそろえて比べたところ、いずれも相当量カドヘリンと共沈することが明らかになった。この結果から、FLfおよびΔN346fはカドヘリンと相互作用することが明らかになった。

さらに、アミノ末端部分を大きく削除することによりカドヘリンとの親和性に差が出るかを検討した。ウイルスによる変異分子の導入効率は実験ごとに微妙に異なるため、免疫沈降と同時に全細胞抽出物を回収し、そこに含まれるFLfとΔN346fの量比と、カド

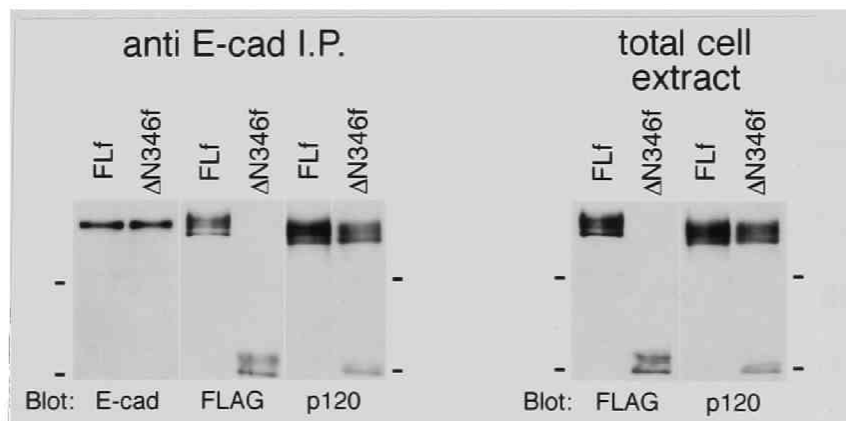
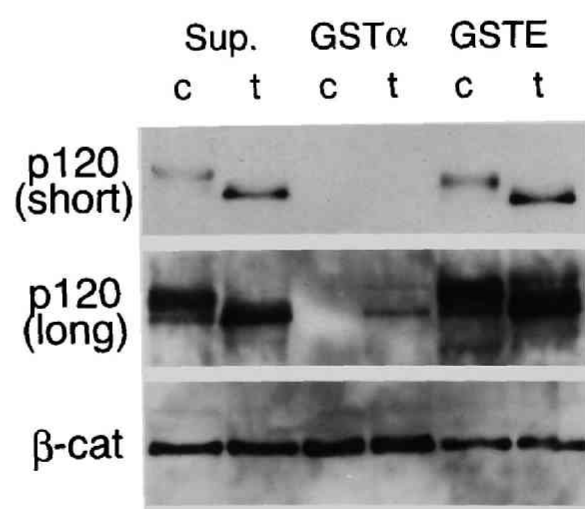


fig.4-12 変異p120 とカドヘリンの相互作用

(A) FLf とΔN346fを導入したColo205細胞を用いてE-カドヘリン抗体による免疫沈降を行い、カドヘリンと相互作用している分子を解析した。カドヘリンの量をそろえて電気泳動しイムノブロットを行った。イムノブロットに用いた抗体は左から順にHECD-1 (E-cad)、D8 (FLAG)、anti-p120 (p120)である。FLf とΔN346f両方ともカドヘリンと相互作用することが確認された。(B) (A) で免疫沈降を行った際に同時に全細胞抽出物を回収しイムノブロットを行った。イムノブロットに用いた抗体は左からD8 (FLAG)、anti-p120 (p120)である。(A) と (B) のD8 で検出した結果の比較から、FLfとΔN346fのカドヘリンに対する親和性には大きな違いはないことが示唆された。分子量マーカーは上から、 83×10^3 、 62×10^3 。



ヘリンと共沈したFLfとAN346fの量比とを比較した (fig.4-12)。すると、カドヘリンと共沈したFLfとAN346fの量比は全細胞抽出物中に含まれるFLfとAN346fの量比とほぼ同じであった。この結果からFLfとAN346fのカドヘリンに対する親和性には大きな違いはないことが示唆された。

これまでの報告によると、p120はカドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニンのなかではカドヘリンのみと直接相互作用することが知られていた (Daniel and Reynolds, 1995; Jou et al., 1996)。Colo205細胞ではこの点がどうなっているかを確かめる目的で、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) とE-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニンとの融合タンパク質 (順にGST-E、GST- α 、GST- β) を合成し、Colo205細胞の溶解物と反応させ、これらの分子と相互作用する分子の中にp120が含まれるかを検討した。ここで融合タンパク質を用いた理由は、免疫沈降法でタンパク質を回収すると、 α -カテニンに対する抗体を用いた場合も β -カテニンに対する抗体を用いた場合も、カドヘリン/カテニン複合体をまとめて回収してしまうため、両者の間に違いが検出できないからである。

TC処理により接着を誘導したサンプルと未処理のサンプルからタンパク質を抽出し、融合タンパク質と氷上で1時間反応させたところ、TC処理したサンプルとcontrolのサンプル両方においてGST-Eにp120が結合した (fig.4-13)。一方、GST- β には両サンプルともp120は結合しなかった。ところが、GST- α と反応させた場合、controlのサンプルのp120は結合しなかったにもかかわらず、TC処理したサンプルのp120は結合した (fig.4-13)。なお、比較のためにGST- α と反応させた同じサンプルを β -カテニンを検出したところ、TC処理前後で結合する β -カテニンの量に差は認められなかった (fig.4-13)。

fig.4-13 (左ページ) p120 とGST融合タンパク質の相互作用

トリブシン処理したColo205細胞と未処理のColo205細胞の溶解物を、GST-EとGST- α と反応させた。Sup, 融合タンパク質と反応させる前のサンプル; GST-E、GST-Eと反応させたサンプル; GST- α 、GST- α と反応させたサンプル; c, 未処理の細胞から回収; t, トリブシン処理した細胞から回収。イムノプロットにより、サンプルに含まれるp120と β -カテニンを検出した。 β -カテニンはGST-EとGST- α のいずれとも相互作用した。p120は短時間の露光ではGST-Eのc、tレーンでバンドを検出した(p120 short)。さらに、長時間露光するとGST- α のtレーンでもバンドを検出した(p120 long)。

Colo205細胞では接着が誘導されたときにp120と α -カテニンが相互作用することが示唆されたので、次にp120の変異分子を導入した細胞を用いて同様の実験を行った。アデノウイルスによりFLf、 Δ N101f、 Δ N157f、 Δ N244f、 Δ N346fを発現させた細胞の抽出液とGST- α を反応させたところ、接着を誘導させることができる Δ N346fだけがGST- α と結合した (fig.4-14)。

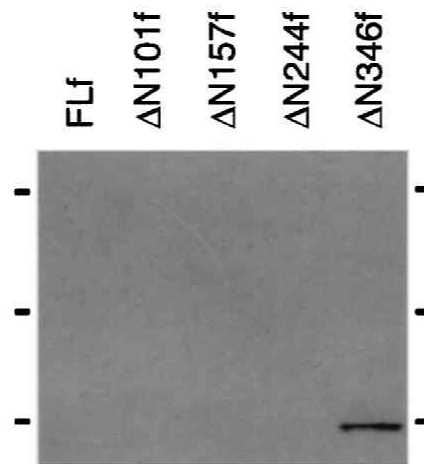


fig.4-14 変異p120 とGST- α -カテニン融合タンパク質の相互作用

FLf、 Δ N101f、 Δ N157f、 Δ N244f、 Δ N346fをアデノウイルスを用いてColo205細胞に導入した。この細胞を48時間培養後回収し、その溶解物とGST- α を反応させた。すると、強固な細胞間接着を誘導する Δ N346fだけがGST- α と相互作用した。分子量マーカーは上から、 175×10^3 , 83×10^3 , 62×10^3 。

4-2-6. p120 のN末欠失分子を他の細胞へ導入したときの効果

Colo205細胞以外の上皮系の細胞において、アミノ末端を欠失したp120変異分子が影響を与えるかを検討した。用いた細胞はヒト大腸癌由来のHT-29細胞とイヌ腎臓上皮由来のMDCK細胞である。ΔN346f分子を導入する前に、まずこれらの細胞の特性を解析した。

普通の上皮細胞は、継代の際に細胞を新しい培養皿に移すと、12時間後には継代操作前に見られたような上皮細胞独特の形態を回復する。しかし、HT-29細胞は継代後24時間を経ても依然として隣りの細胞とはあまり接着せず丸いままであり、48時間後になってようやく細胞間接着が認められるようになる (fig.4-15)。この観察結果をもとに、継代後18時間培養したHT-29細胞に staurosporine を加え培養した。すると、7 nM の staurosporine を添加し6時間培養すると、細胞間接着が促進された。また、継代後24時間培養したものにColo205細胞の時と同様のトリプシン処理を行ったところ、このサンプルにおいても同じような細胞間接着の誘導が認められた (fig.4-15)。さらに、イムノブロット法によりHT-29細胞のp120を検出したところ、興味深い結果が得られた。継代操作直後のHT-29細胞では、接着を誘導したColo205細胞のp120と同じ位置に1本のバンドとして検出されたのが、24時間後、一旦は複数のバンドとして検出され、さらに継代48時間後には再び低分子量側の位置の1本のバンドとして検出された (fig.4-15B)。また、継代24時間後に見られたp120の複数のバンドは、staurosporineやトリプシン処理により接着が促進されると、下の位置の1本のバンドになった (fig.4-15B)。これらの結果から、HT-29細胞はColo205細胞と同様に、staurosporineおよびトリプシンに応答してカドヘリンの機能が回復する細胞であることが明らかになった。

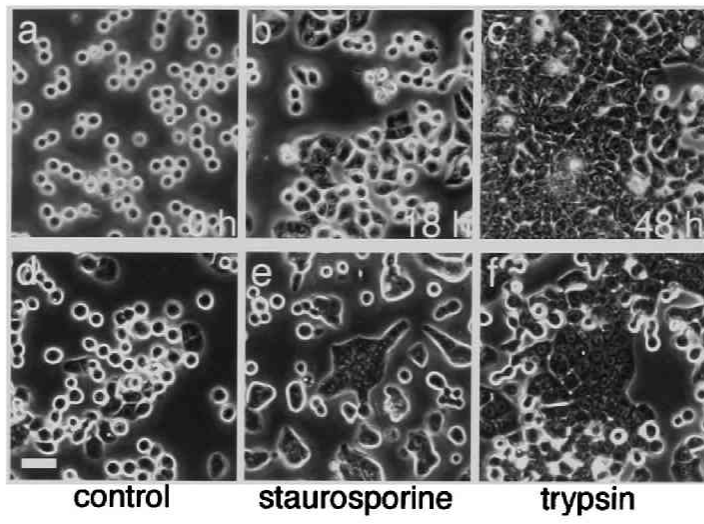
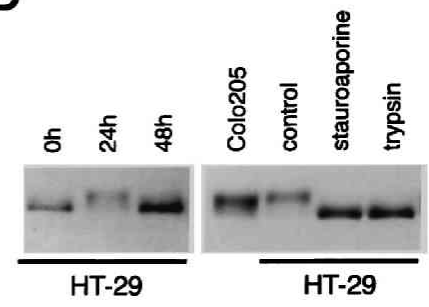
A**B**

fig.4-15 (左ページ) HT-29細胞とその p120

(A) HT-29細胞の位相差顕微鏡像。(a) 継代操作直後。(b) 継代操作後18時間培養。(c) 継代操作後48時間培養。(d) e, fの実験のコントロール (継代操作後24時間培養) (e) 継代操作後18時間培養したものに7.0 nMの staurosporineを加えてさらに6時間培養。(f) 0.001% のトリプシンで30分処理。(B) HT-29細胞のp120のイムノブロット解析。0h、継代操作直後; 24h、継代操作後24時間培養; 48h、継代操作後48時間培養; control、継代操作後48時間培養; staurosporine、継代操作後18時間培養したものに7.0 nM の staurosporineを加えてさらに6時間培養; trypsin、0.001% のトリプシンで30分処理。Bar, 40 μ m。

MDCK細胞は上皮細胞の代表格として広く研究に用いられている。この細胞はHT-29細胞と異なり、継代後は速やかに上皮のシートを形成する。この細胞をstaurosporineやトリプシンで処理したが、細胞間接着には大きな影響は見られなかった (fig.4-16)。また、イムノブロット法でp120を検出したがバンドのパターンに大きな変化は認められなかった。このことから、MDCK細胞はstaurosporineやトリプシンによって細胞間接着が影響を受けないことが明らかになった (fig.4-16)。なお、fig.4-16Bで矢じりで示したp120のバンドはp120のスプライスバリエントである (Mo and Reynolds, 1996)。

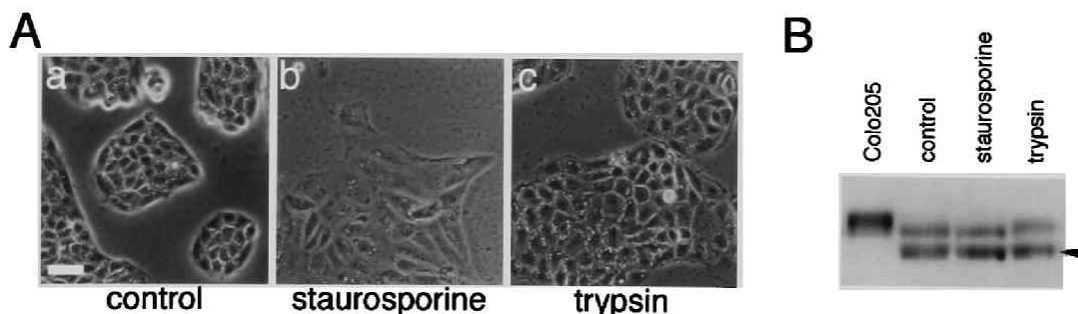


fig.4-16 MDCK細胞とその p120

(A) MDCK細胞の位相差顕微鏡像。(a) 未処理。(b) 7.0 nM の staurosporineを加え6時間培養。(c) 0.001% のトリプシンで30分処理。(B) MDCK細胞のp120のイムノブロット解析。control、未処理; staurosporine、7.0 nM の staurosporineを加えて6時間培養; trypsin、0.001% のトリプシンで30分処理。Bar, 40 μ m。

以上の観察を踏まえて、HT-29細胞とMDCK細胞にFLfおよび Δ N346fを導入したときにこれらの分子が細胞間接着に与える影響を検討した。HT-29細胞には継代処理終了直後にアデノウイルスを用いて改変p120分子を導入し、24時間培養後に観察した。すると、FLfを発現している細胞はfig.4-17A-aのように丸い形をしているのに対し、 Δ N346fを発現する細胞では細胞間接着が促進された (fig.4-17A-b)。同じ視野を明視野で観察すると、FLfのほうではひとつひとつの細胞が分かれているのがはっきりわかるのに対して、 Δ N346fでは細胞どうしが密に接しているために個々の細胞の形が不明瞭であった。

MDCK細胞にはエレクトロポレーション法で改変p120分子を導入し、72時間培養後観察した。結果は、FLf、 Δ N346fとも細胞間接着部位に濃縮し、蛍光染色像や位相差像を見るかぎりにおいては細胞間接着には何も影響を与えていないように思われた (fig.4-17B)。

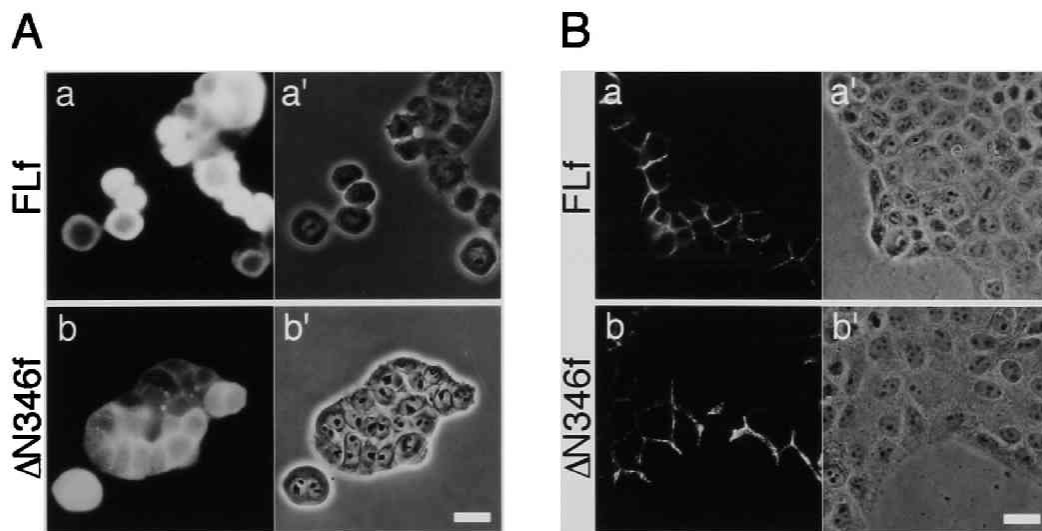


fig.4-17 HT-29細胞、MDCK細胞に Δ N346fを導入したときの効果

(A) HT-29細胞にFLf、 Δ N346fを導入したときの効果。a,a'、FLf; b,b'、 Δ N346f。a、bは抗FLAG抗体による抗体染色像、a'、b'はa、bと同一視野の位相差顕微鏡像。 Δ N346fが細胞間接着を誘導した (a)。(B) MDCK細胞にFLf、 Δ N346fを導入したときの効果。a,a'、FLf; b,b'、 Δ N346f。a、bは抗FLAG抗体による抗体染色像、a'、b'はa、bと同一視野の位相差顕微鏡像。FLf、 Δ N346fとも細胞間接着部位に濃縮した。Bar, 20 μ m。

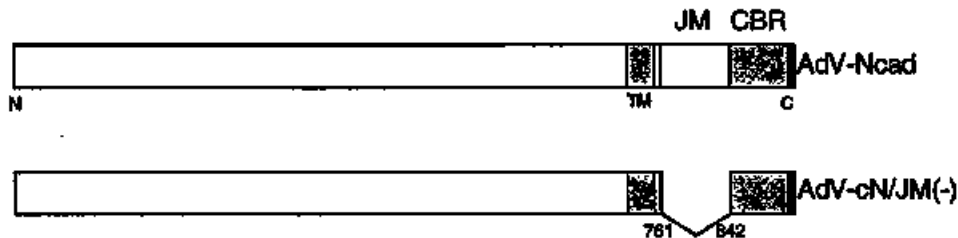


fig.4-18 カドヘリンの変異分子、cN/JM(-)

カドヘリンの細胞質領域は機能的に2つに分けられる。 β -カテニンが結合するCBR領域 (CBR; Catenin Binding Region) とp120が結合する、より細胞膜側のJM領域 (JM; Juxta-Membrane domain) である。本研究ではニワトリのN-カドヘリンの正常分子Ncadと、JMを欠く分子cN/JM(-)を用いた。NcadとcN/JM(-)は接着活性を有することがすでに明らかになっている。ニワトリN-カドヘリンベースにした理由は内在のヒトE-カドヘリンとの区別が容易であるためである。TM: 膜貫通部位。

4-2-7. カドヘリンの変異分子、cN/JM(-)をColo205細胞へ導入したときの効果

これまでの結果から、Colo205細胞やHT-29細胞ではp120によりカドヘリンの機能が阻害されていることが強く示唆された。仮にこの仮説が正しいとすれば、p120と相互作用できないカドヘリンの改変型分子はこれらの細胞の細胞間接着を回復させる可能性が考えられる。そこでこの仮説を検証する実験をColo205細胞を用いて行った。

カドヘリンの細胞質領域内でp120が相互作用する領域がすでに明らかになっている (Yap et al., 1998)。この領域は、 β -カテニンが結合する領域 (CBR; Catenin Binding Region) とは独立した部位であり、より細胞膜側 (JM; Juxta-Membrane domain) にある (fig.4-18)。興味深いことにこのJM領域を欠くカドヘリン分子は接着分子として機能することが知られている (Nakagawa; 未発表)。そこで、この分子をColo205細胞に導入する実験を行った。ニワトリのN-カドヘリンの正常分子N-cadとJMを欠くcN/JM(-)をアデノウイルスを

用いてColo205細胞に発現させたところ、N-cadでは形態の変化は観察されなかったのに対して、cN/JM(-)の方では細胞間接着の誘導が認められた (fig.4-19A)。この接着はニワトリN-カドヘリンの機能阻害抗体NCD-2では阻害された。このことから、cN/JM(-)が誘導した細胞間接着はニワトリN-カドヘリン依存性のものであることが明らかになった。さらに抗体染色により導入した分子を観察したところ、N-cadが細胞膜に沿って一様に分布していたのに対して、接着を誘導したcN/JM(-)分子は細胞間接着部位に強く濃縮していた。以上の結果から、cN/JM(-)はドミナントネガティブに働いているのではなく、直接接着分子として機能し、Colo205細胞の細胞間接着を誘導していることが示唆された (fig.4-20A)。

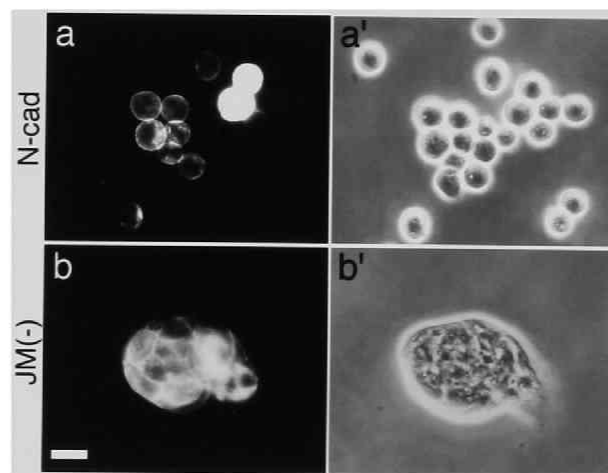


fig.4-19 cN/JM(-)をColo205 細胞へ導入したときの効果 (1)

N-cad、cN/JM(-)をColo205細胞に導入した細胞の形態。a,a'、N-cad; b,b'、cN/JM(-)。a、bは位相差顕微鏡像、a'、b'はa、bと同一視野の抗ニワトリN-カドヘリン抗体による抗体染色像。cN/JM(-) が細胞間接着を誘導した (b)。Bar, 20μm。

さらに、cN/JM(-)はColo205細胞においてp120と相互作用しているか否かを免疫沈降法により解析した。アデノウイルスによりN-cad、cN/JM(-)を導入した細胞からNCD-2を用いて免疫沈降を行い相互作用している分子をイムノブロット法で解析した。すると、 β -カテニンはN-cad、cN/JM(-)に等しく結合していたのに対して、p120はN-cadには結合していたが、cN/JM(-)には結合していなかった (fig.4-20B)。以上の結果から、Colo205細胞ではカドヘリンはp120と相互作用しなければ接着分子として機能できることが明らかになった。さらに、p120はカドヘリンの負の制御因子であり、カドヘリンの接着機能には必須ではないことが示唆された。

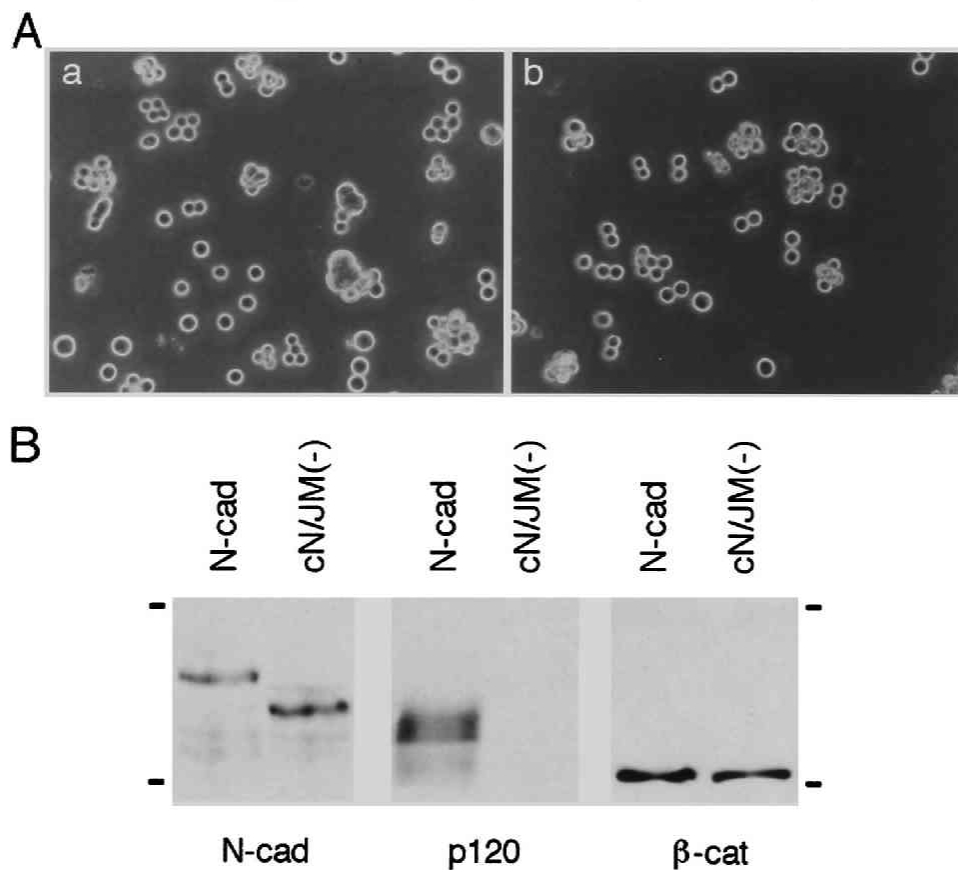


fig.4-20 cN/JM(-)をColo205 細胞へ導入したときの効果 (2)

(A) cN/JM(-)により誘導される細胞間接着はニワトリN-カドヘリン依存的である。cN/JM(-)を導入した培養にニワトリN-カドヘリンの機能阻害抗体NCD-2を加えると、細胞間接着は阻害された。(a)、抗体なし; (b)、抗体あり。(B) Colo205細胞に導入したcN/JM(-)はp120と相互作用しない。アデノウイルスによりN-cad、cN/JM(-)を導入した細胞からNCD-2を用いて免疫沈降を行い相互作用している分子をイムノブロット法で解析した。N-cadにはp120が結合していたのに対して、cN/JM(-)にはp120は結合していなかった。 β -カテニンはcN/JM(-)にもN-cadと同程度結合していた。Bar, 40 μ m。分子量マーカーは上から、 175×10^3 , 83×10^3 。

4-3. 考察

4-3-1. p120はカドヘリンの負の制御因子である

Colo205細胞とHT-29細胞はともにstaurosporineやトリプシンに応答しカドヘリンが活性化され、しかもその際にp120のリン酸化に変動が認められる細胞である。これらの細胞にアミノ末端側の346アミノ酸を欠いたp120の変異分子、 $\Delta N346f$ を強制発現させたところ、Colo205細胞ではカドヘリンの機能が回復し、また、HT-29細胞ではカドヘリンによる細胞間接着が促進された。p120の変異分子を導入するによってカドヘリンの機能が活性化されたことから、これらの細胞ではp120を介してカドヘリンの機能が制御されていることがより強く示唆された。一方、staurosporineやトリプシンによって細胞間接着が影響を受けず、またp120にリン酸化にも変化が認められないMDCK細胞では、 $\Delta N346f$ は細胞間接着になんら影響を与えていないことが明らかになった。

これまでたびたび触れてきてように、成長因子の投与や癌遺伝子の形質導入などにより細胞間接着が破壊される際に、p120がリン酸化されるという報告はこれまでもいくつかある (Shibamoto et al., 1995; Kinch et al., 1995; Skoudy et al., 1996; Lampugnani et al., 1997; Rosato et al., 1998)。しかしながら、p120のリン酸化がカドヘリンが機能できなくなる直接の原因であることを示した例はこれまでまだなかった。本研究ではColo205細胞やHT-29細胞において、カドヘリンが十分機能できない状態でp120が過剰にリン酸化されていることを示しただけでなく、これらの細胞株にp120の変異分子 $\Delta N346f$ を導入することよりカドヘリンの機能が回復することを示した。これは、p120がある特定の細胞株において細胞間接着が正常に形成されない直接の原因であることを示した初めてのケースである。

カドヘリンの変異分子、cN/JM(-)がColo205細胞の細胞間接着を回復させた。この分子を導入することで誘導される細胞間接着はN-カドヘリンの阻害抗体により阻害されたことから、この細胞間接着はcN/JM(-)依存的であると考えられる。cN/JM(-)はカドヘリン

unknown
transmembrane
protein



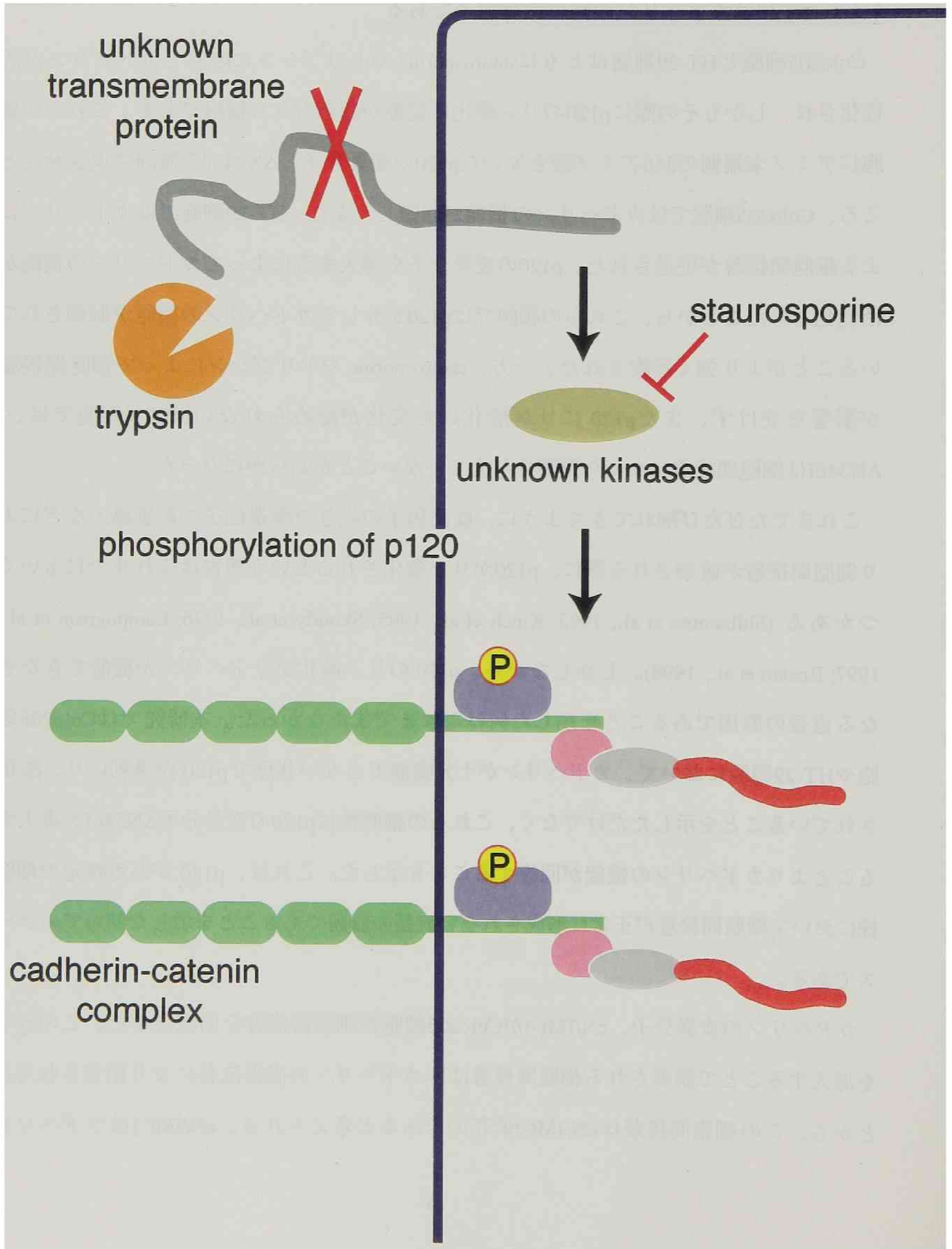
trypsin

staurosporine

unknown kinases

phosphorylation of p120

cadherin-catenin
complex



の細胞質領域に含まれるいくつかの保存された配列の中で、p120との相互作用に必要な領域を欠失したもので (Yap et al., 1998)、実際Colo205細胞に導入されたこの分子はp120と相互作用していない。この結果から、Colo205細胞ではカドヘリンはp120と相互作用しなければ接着分子として機能できることが明らかになった。

以上の結果はp120の機能を想像するうえでたいへん興味深い。まず、 β -カテニンがカドヘリンの機能に欠くことのできない分子であるのとは対照的に、p120はカドヘリンの接着分子としての機能には必須ではないことが明らかになった。さらに、この分子は周囲の状況によって時として負の制御因子として機能する全く新しいタイプのカドヘリン結合タンパク質であることが明らかになった。

第2章で触れたように、ある種の癌細胞では細胞表面上に存在するプロテオグリカンやムチンなどの巨大分子により、カドヘリンの機能が抑えられていることが報告されていた。トリプシン処理によりColo205細胞のカドヘリンの機能が回復することから、この細胞においても同様の現象がおこっている可能性が考えられた。しかし、Colo205細胞では、p120やカドヘリンの変異分子を導入することにより細胞の内側から働きかけた際にも、細胞間接着が回復することが明らかになった。このことから、Colo205細胞ではプロテオグリカンなどの巨大分子によってカドヘリンの機能が抑えられている可能性が完全に否定された。

fig.4-21 (左ページ) Colo205細胞におけるp120を介したカドヘリンの機能制御のモデル 通常の培養条件下では、トリプシンの標的である膜分子からp120にシグナルが伝わり、これらがリン酸化されるために、カドヘリンは不活性化されている。トリプシンがこの分子を分解するとこのカスケードがオフになりp120が脱リン酸化され、カドヘリンの機能が回復する。staurosporineはシグナル伝達の過程に存在するカイネースに作用する。トリプシンの標的である膜分子と、staurosporineの標的であるカイネースが、同一である可能性もありうる。

4-3-2. p120のリン酸化とカドヘリンの制御

第3章で示したように、カドヘリンが機能していない通常の培養条件下のColo205細胞にはp120は過剰にリン酸化されているが、staurosporineやトリブシン処理によりカドヘリンの機能が回復するとp120が脱リン酸化された。このことから、p120のリン酸化によってカドヘリンの機能が可逆的に制御されている可能性が考えられた (fig.4-21)。しかしながら、Colo205細胞の接着を回復させるΔN346fタンパク質は、イムノプロット法で解析した結果ブロードなバンドとして検出され、しかもΔN346fタンパク質を発現している細胞をトリブシン処理するとブロードだったバンドが最も低分子量側のシャープな1本のバンドにシフトした。この結果から、ΔN346fタンパク質はトリブシン処理より脱リン酸化されることが示唆された。さらに、TC処理で脱リン酸化されるp120のサイトはp120のアミノ末側346アミノ酸の領域には含まれないことが明らかになった。

ここで、2つの疑問が生じた。一つ目はp120はリン酸化によりカドヘリンの機能を制御しているのか？という疑問である。

ΔN346fタンパク質がトリブシン処理より脱リン酸化されるということは、ΔN346fタンパク質は、Colo205細胞の接着の状態に相関してリン酸化／脱リン酸化されるp120のサイトがリン酸化されているということである。では、接着を誘導するΔN346fタンパク質がリン酸化されているということは、Colo205細胞やHT-29細胞においてp120のリン酸化はカドヘリンの機能の抑制とは無関係なのであろうか？アミノ末端を削除した分子のイムノプロット法による解析結果をよくみると、削除される領域が大きくなるにしたがってTC処理のときのように相対的に下の位置のバンドの割合が増す傾向が見られる (fig.4-9; 本編 56ページ)。このような一見中途半端な結果が得られた原因の一つとして、p120をリン酸化する仮想上のカイネースとp120との相互作用がアミノ末端を削ることにより異常になり、リン酸化されるp120の割合が減少する可能性が考えられる。この結果はp120のリン酸化による制御機構が存在する可能性を示唆するものである。この問題に対するより明確な答えを得るために、今後トリブシン処理により脱リン酸化されるp120のサイトを特定し、そのアミノ酸を別のアミノ酸に置換した分子を用いて解析を行

う必要がある。

第二の疑問はstaurosporine、トリブシンや変異p120 分子は同じ経路をたどってカドヘリンの機能を回復させているのだろうか？という点である。第三章で示したように、イムノプロット法で解析した結果、staurosporine、トリブシンいずれの処理を施した後にも類似したp120のバンドパターンの変化が検出された (fig.3-1, 2; 本編 37, 38ページ)。処理開始後効果が認められるまでの時間に差が見られたが、staurosporineも濃度をあげると極く短時間で接着を誘導することを考慮すると、staurosporineやトリブシンからp120に至る経路は恐らく同じであるのではないだろうか。

トリブシンや変異p120 分子は同じ経路をたどってカドヘリンの機能を回復させているかどうかについて、残念ながら今の時点では明確に答えることはできない。前節で触れたように、もしp120のリン酸化によってColo205細胞のカドヘリンの機能が制御されているとことが確かになれば、staurosporine、トリブシン処理と変異p120 分子は同経路をたどってカドヘリンに作用している可能性も考えられる。しかし、p120 はリン酸化とは無関係にカドヘリンの機能を制御していることも十分考えられる。さらに、アミノ末端を削ったp120がColo205細胞のカドヘリンの機能を回復させるメカニズムはよくわかっていない。今後、この疑問により正確に答えるために、Colo205細胞においてp120 をリン酸化するカイネースを同定することが重要であると同時に、p120のアミノ末端側346アミノ酸の機能を明らかにすることが必要とされる。

4-3-3. p120のリン酸化部位、セリン vs チロシン

p120はv-srcを導入することにより形質転換した細胞においてチロシン残基がリン酸化される分子として同定された。しかしながら今回われわれが用いたColo205細胞においては、セリン残基のリン酸化が検出されたのに対して、チロシン残基のリン酸化は検出されなかった (fig.3-7)。この理由についてはいくつか考えられる。第一に、実験に用いた細胞の違いなどの実験条件の違いである。p120を同定したグループはp120のリン酸化

の検討にNIH3T3繊維芽細胞をもちいていたのに対し、われわれの用いているColo205細胞は上皮細胞である。同じく上皮系の細胞であるMDCK細胞では通常の培養条件でp120のセリン残基がリン酸化されることが報告されている (Ratcliffe et al., 1997)。

第二に、p120はリン酸化されうる場所を複数持ち、それぞれ別の機能を担っているというものである。リン酸化サイトの違いに元ずくp120の機能の使い分けの可能性が考えられる。カドヘリンの活性を制御する必要がある現象としては細胞の分裂時におけるカドヘリンの不活性化、細胞が移動するときの細胞間接着の制御などが考えられている。例えば、p120との相互作用に必要な細胞質領域の一部分を欠くカドヘリン分子を発現させた細胞では、細胞の移動が抑えられることが明らかになった (Chen et al., 1997)。また、カドヘリンと α -カテニンの融合キメラ分子を発現させた細胞は、細胞分裂の際細胞間接着構造が維持されたまま分裂する (Nagafuchi et al., 1994)。ひとつの可能性として、移動するときのカドヘリンの不活性化にはチロシンのリン酸化が、細胞が分裂する際のカドヘリンの不活性化にはセリンのリン酸化が必要なかもしれない。実際に細胞分裂時に、恐らくcdc2カイネースによりp120のセリン残基がリン酸化されるという報告がある (Bauer et al., 1998)。

ここに2つの可能性を示したが第三の可能性として、これまでに報告されているp120のリン酸化の中には生理学的観点から見て全く無意味のリン酸化を含んでいる可能性も考えられる。今後、この問題を解決するためにさまざまな細胞においてp120がリン酸化される場所を明らかにし、その部分を別のアミノ酸に置換した分子を用いてさらに詳細に解析を行う必要がある。

4-3-4. p120と α -カテニンの相互作用

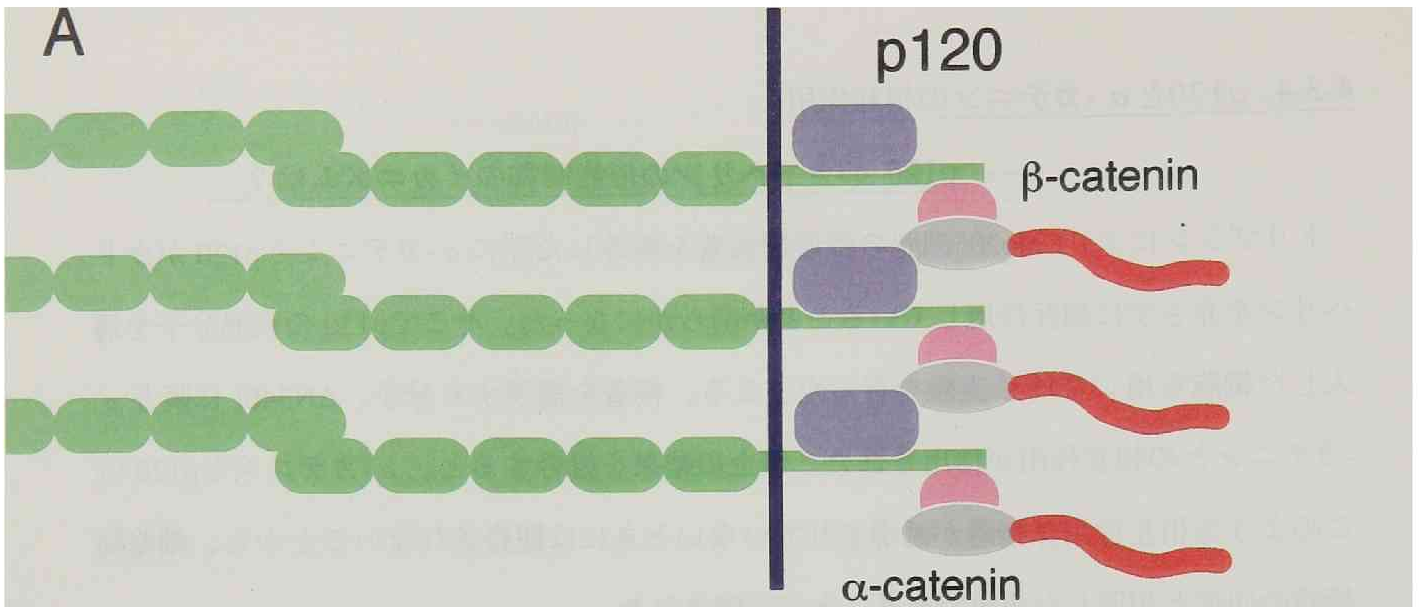
----- p120 のカドヘリンの機能制御のメカニズムは？

トリプシンによりColo205細胞の細胞間接着を誘導した際に α -カテニンとp120がカドヘリンを介さずに相互作用していることが明らかになった。そこでp120の変異分子を導入した細胞を用いて同じ実験を行ったところ、接着を誘導する分子、 $\Delta N346f$ に限り α -カテニンとの相互作用が検出された。以上の結果を総合すると、 α -カテニンとp120のこのような相互作用は接着が誘導されていないときには観察されないことから、細胞間接着の回復と関連した現象であることが示唆された。

この α -カテニンとp120の相互作用はいったい何を物語っているのでしょうか？第二章の考察でも触れたように、コンパクトな集合塊すなわち強固な細胞間接着の形成には、カドヘリン分子のクラスターリングやアクチン骨格系とのリンクにより、個々のカドヘリン分子がさらに高次の構造体を形成することが必要であると広く認知されている。Colo205細胞でおこっている接着の誘導はまさにこの高次構造の形成過程であるといえ、p120と α -カテニンの相互作用は強固な細胞間接着の形成に欠くことのできない現象であると考えられる。さらに、p120はリン酸化されると α -カテニンと結合しないことから、p120が α -カテニンとの相互作用を介してカドヘリンの機能をコントロールしている可能性が高いと思われる。

ではどのような仕組みでp120と α -カテニンはカドヘリンの機能を制御しているのでしょうか？一つ目は隣りあう二つのカドヘリン分子のクラスターリングに α -カテニンとp120の相互作用が利用されているというものである。p120がリン酸化されていると α -カテニンと結合できないためクラスターリングできず、結果的に強固な接着が形成できないというものである(fig.4-22A)。しかしながら、このモデルを否定する結果がすでに得られている。すなわち、p120と相互作用しないカドヘリン分子、cN/JM(-)をColo205細胞に導入すると細胞間接着が誘導された(fig.4-19)。この結果はp120はカドヘリンの強固な接着活性に必要ではないことを示しているからである。 α -カテニンはカドヘリンのアクチン骨格系との相互作用に必須の分子であることから、第二に、リン酸化された

A



B

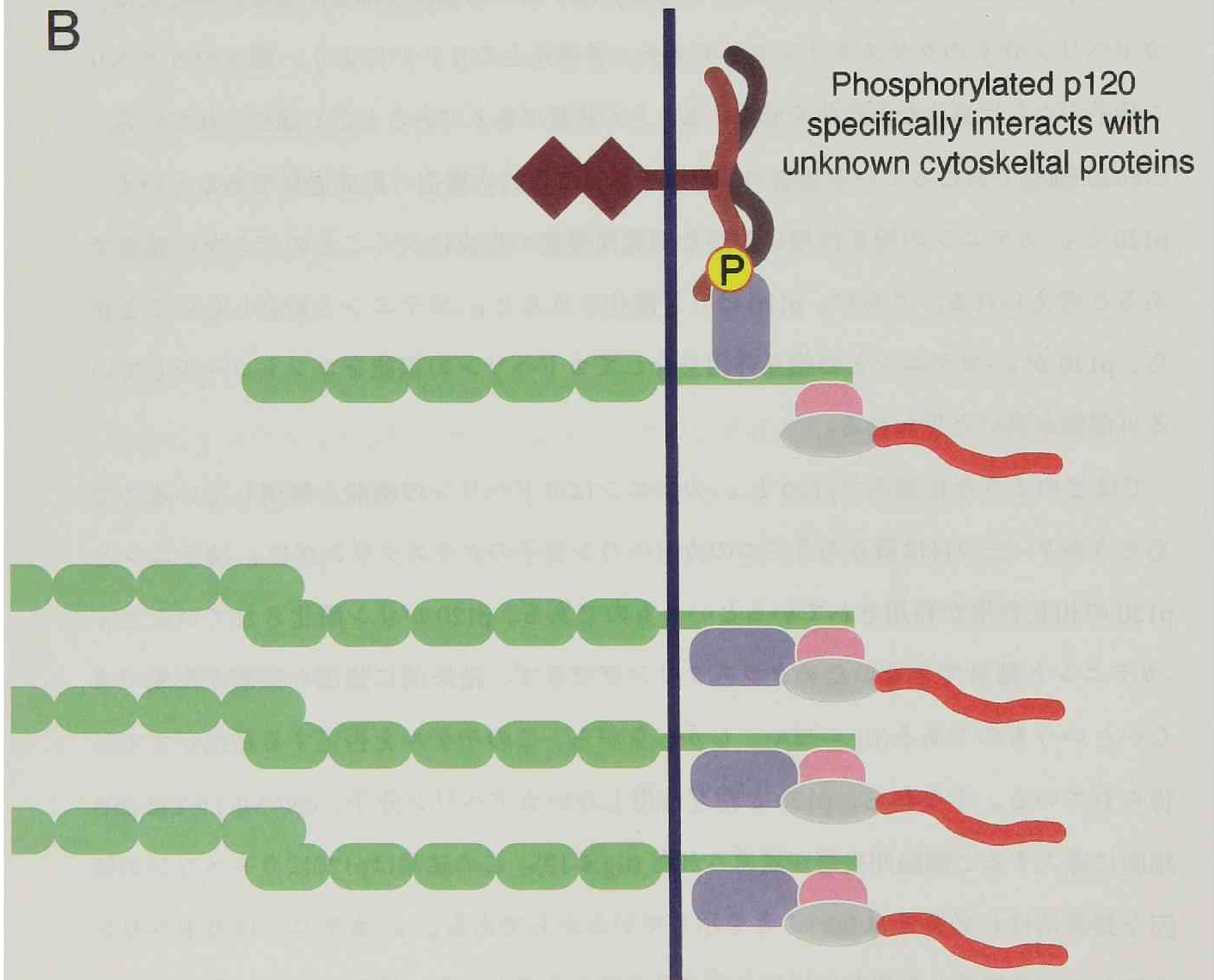


fig.4-22 (左ページ) α -カテニンとの相互作用を介したp120のカドヘリンの機能制御

(A) α -カテニンとp120の直接の相互作用が強固な細胞間接着の形成に必要である。(B) リン酸化されたp120は未知の骨格系分子と相互作用する。その結果カドヘリンはアクチンと相互作用できなくなり強固な接着が形成されない。しかし、p120が脱リン酸化されると α -カテニンと結合することによりp120は未知の骨格系分子と相互作用できなくなる。その結果カドヘリンの機能が回復する。

p120 が α -カテニンとアクチン骨格系との結合を妨害することに、よりカドヘリンの機能を抑制している可能性が考えられる。ただ、 α -カテニンと相互作用するのは脱リン酸化されたp120で、リン酸化されたp120 は α -カテニンと相互作用しないという実験結果が得られていることから、正確には、カドヘリンが十分機能している状態では α -カテニンがp120 の α -カテニン妨害活性を抑えていて、p120 がリン酸化されると α -カテニンから外れ α -カテニン妨害活性を抑えきれなくなり、最終的にカドヘリンが機能できなくなるという解釈が妥当かもしれない。

4-3-5. 生体内での p120の機能は何か？

p120がカドヘリンの機能を制御していることが強く示唆された。そこで次に生体内でのp120 の機能について興味をもたれる。Geis らはアフリカツメガエルの受精卵の腹側にp120の全長のmRNAを注入する実験を行った。同様の実験を β -カテニンのmRNAを用いて行くと、Wnt シグナルカスケードが活性化され二次軸の誘導が観察されることが知られているが、p120の全長のmRNAを注入した場合二次軸の誘導は観察されなかった。このことから、p120 はアルマジロリピートを持つ点でタンパク質の1次構造上 β -カテニンと似ているにもかかわらず、Wnt/Wg シグナル系には関与しないことが明らかになり、

p120 を受精卵の背側にp120の全長のmRNAを注入すると胞胚孔が閉じるのが遅れることが明らかになり、このことから、p120 が細胞の移動を制御している可能性が示唆された (Geis et al., 1998)。また、カドヘリンの細胞内領域に含まれるp120との相互作用に必要な部分をアフリカツメガルの網膜神経細胞に強制発現させたところ、軸索の伸長が抑えられることが明らかになった (Riehl et al., 1996)。この現象は間接的にp120の機能を妨害した結果によるものである可能性があり、今後この系を用いてp120についてより直接的に調べることによりp120の機能が解明されることが期待される。さらなる、機能解析の手法としてノックアウトマウスの作製が考えられるが、p120のように恐らく発生の極く初期から発現している分子の場合、発生の早いステージで表現系が現れてしまい、発生の後期でのp120の機能が解析できない可能性が考えられる。また、p120 のように類似分子が多数同定されている場合、他の類似分子によりp120 の機能が補完され、逆に表現型が現れない可能性が考えられる。その点において、本研究で用いた $\Delta N346f$ などのp120 の変異分子は内在の分子に対してドミナントに機能することが期待されるため、p120 の機能解析にこの分子を利用することは非常に有用であると思われる。今後p120が生体内でどのような機能を発揮しているかを明らかにされることが期待される。

4-3-6. その他の今後の課題

これまで重ねて述べてきたように、p120はリン酸化によりカドヘリンの機能を制御していることが強く示唆された。p120の機能が明らかになった今、次なる興味はp120をリン酸化する分子が何かという問題であろう。このp120をリン酸化する分子を同定することは、単にp120の機能を理解するにとどまらず、発生における細胞の移動 接着の制御や細胞の癌化 悪性化のメカニズムの理解の助けになるものと思われる。今後この方面での研究が進展することが期待される。

また、p120 はアルマジロファミリーのなかでも独立したサブファミリーを形成してい

る。このサブファミリーに属する分子のいくつかは中間径フィラメントと直接的に相互作用していることがすでに知られている。今後p120 と中間径フィラメントとの相互作用を含め、p120 のカドヘリン以外の結合相手を探すことは大変意義深いことであると考えている。

第五章

材料、方法

第五章 材料、方法

本研究に用いた細胞

細胞株名	由来／特性	文献
COLO205	ヒト大腸癌	Semple et al., 1978
HT-29	ヒト大腸癌	Fogh and Trempe, 1975
MDCK	イヌ腎臓	Gaush et al., 1965

複数の実験に用いた試薬

細胞培養液

DH10

Dulbecco's modifies Eagle's MEM (Nissui)	2.5 g
Ham's F12 medium (Nissui)	2.65 g
glucose	1.75 g
NaHCO ₃	1.05 g
Fetal Calf Serum	50 ml
Penicillin (明治)	25000 unit
Storeptomycin (明治)	25 mg
Fungizon	0.25 μ g
	total 500 ml

緩衝溶液

HCMF

NaCl	4.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.06 g
HEPES	1.2 g
glucose	0.5 g
phenol red	若干量
NaOH	1.6 ml
	total 500 ml

HBSS

HCMF+1 mM CaCl_2 +1 mM MgCl_2

PBS(+)

Na_2HPO_4	0.994 g
NaH_2PO_4	0.36 g
NaCl	7.6 g
total 1000 ml	

TBS-Ca

50 mM Tris-Cl pH 7.6

150 mM NaCl

1 mM CaCl_2

2x SDS sample buffer

125 mM Tris-Cl pH 6.8

2 % SDS

20 % Glycerol

0.002 % BPB

抗体および標識試薬

本研究に用いた抗体および標識試薬を以下に示す。

<一次抗体>

認識分子	抗体名	用途 ^注	ホスト	文献	販売元
E-cadherin	HECD-1	W, IP, IF	mouse	Shimoyama et al., 1989	
	SHE 78-7	B	mouse	Nagafuchi et al., 1988	
N-cadherin	NCD-2	All	rat	Shirayoshi et al., 1986	
	anti N-cadherin	B	rabbit	Hatta et al., 1988	
α E-catenin	α 18	W	rat	Nagafuchi et al., 1994	
	anti α -catenin	W, IP	mouse	Transduction Laboratories	
β -catenin	anti β -catenin	W	rabbit	Shibamoto et al., 1995	
	5H10	W, IP	mouse	Johnson et al., 1993	
p120	anti pp120	W, IP	mouse	Transduction Laboratories	

FLAG tag	M2	IP, IF, W	mouse	Sigma Chemical Co.
	D8	W	rabbit	Santa Cruz Biotech. Inc.
MUC1	MY.1E12	IF	mouse	Yamamoto et al., 1996

注)	W	---	イムノプロット
	IP	---	免疫沈降
	IF	---	免疫組織化学
	B	---	阻害実験
	All	---	上記のすべて

<二次抗体／三次試薬>

認識分子	抗体名 ^注	販売元
mouse IgG	NA9310 (HRP)	Amersham
	62-6541 (Sephrose4B)	ZYMED
	AP-124C (Cy3)	Chemicon
rat IgG	NA932 (HRP)	Amersham
rabbit IgG	3212-008 1(HRP)	Cappel
	AP-182C (Cy3)	Chemicon
	RPN1004 (ビオチン)	Amersham
mouse IgG / rabbit IgG	71-1083-00 (proteinG sepharose 4FF)	Pharmacia

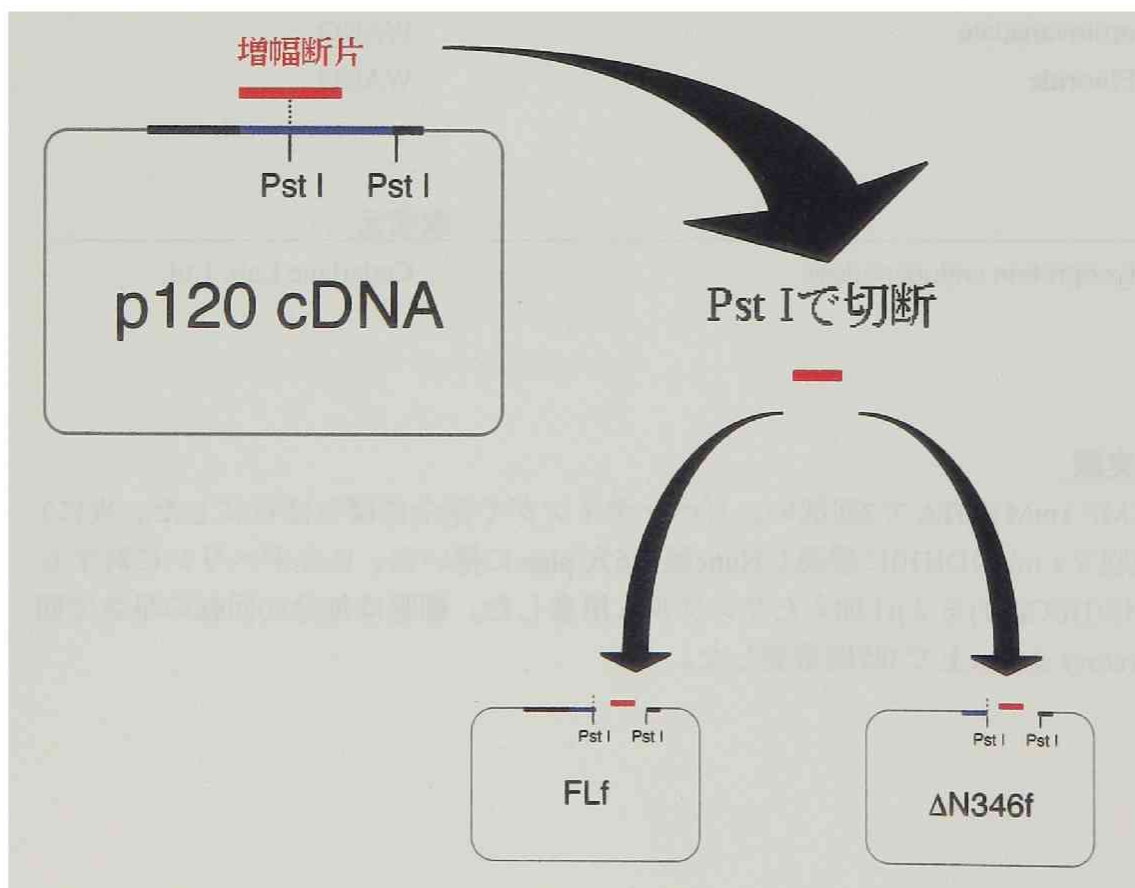
注)	HRP	---	horse radish peroxydase 結合型抗体
	sepharose4B	---	sepharose 4B 結合型抗体
	Cy3	---	Cy3 結合型抗体
	ビオチン	---	ビオチン 結合型抗体
	proteinG sepharose 4FF	---	proteinG 結合型 sepharose 4FF

カドヘリンの機能回復実験に用いた阻害剤

カイネース阻害剤	文献・販売元
herbimycin A	KYOWA
Methyl 2,5-dihydroxy cinnamate	Life Tech.
Lavendustin A	Life Tech.
Genistein	Life Tech.
R-CAM	Life Tech.
Tyrphostine	Life Tech.
2-hydroxy-5-(2,5-dihydroxybenzyl)aminobenzoic acid	Life Tech.
ML-7	BIOMOL
HA 1004	BIOMOL
H-7	BIOMOL
H-8	BIOMOL
Staurosporine	UBI
Calphostine C	RBL
UCN-01	Takahashi et al., 1990
7-O-methyl UCN-01	Takahashi et al., 1990
フォスファテース阻害剤	販売元
Sodium orthovanadate	WAKO
Sodium Fluoride	WAKO
その他	販売元
O-sialoglycoprotein endopeptidase	Cedarlane Lab. Ltd.

細胞集合実験

細胞をHCMF 1mM EDTA で2回洗い、ピペッティングで完全にばらばらにした。次に 2×10^5 個の細胞を1 ml のDH10に懸濁しNunc製の6穴 plateに捲いた。E-カドヘリンに対する機能阻害抗体(HECD-1)を2 μ l 加えたサンプルも用意した。細胞は毎分80回転の早さで回転させたgyratory shaker上で3時間培養した。



細胞への形質導入

Colo 205 細胞にはエレクトロポレーション法並びにアデノウイルスを用いて形質導入を行った。エレクトロポレーションは以下の方法で行った。トリプシン処理により完全にばらばらにした細胞 4×10^5 個を 200 μ l の HBSS に懸濁した。そこに 20 μ g の発現ベクターを加え、1160 μ F, 250 V の条件で電気発火させた。アデノウイルスによる形質導入の際は、 1×10^6 個の細胞を 5×10^7 PFU のアデノウイルスとともに 500 μ l の DH10 に懸濁し 4 時間培養後、ウイルスをのぞきさらに 48 時間培養した。

HT-29 細胞にはアデノウイルスにより形質導入した。MDCK 細胞にはエレクトロポレーション法によって形質導入した。細胞と発現ベクターの調整は Colo 205 細胞の時と同じであるが電気発火の条件は 1060 μ F, 200 V で行った。

cDNA の作製

mouse p120 の cDNA は A. Reynolds (Vanderbilt Univ.) から頂いた。この cDNA をテンプレートとして用いて、PCR 法により FLAG tag を付加した p120 (FLf) や他の変異分子を作製した。PCR には以下のプライマーを用いた。

Primer N, 5'-GAATTCATGGACGACTCAGAGGTG-3';

Primer A, 5'-GAATTCATGTTAGCAAGCTTGGATAGTTTG-3';

Primer CR, 5'-GAATTCGATATCCTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCAATCTTCTGCATCAAGGGTGC-3';

Primer Δ AR, 5'-CTGCAGGAAATCCACTGTATCATT-3'.

Primer CR は 5' 側に EcoRV の制限酵素サイトと stop codon および FLAG tag の相補配列を含む。FLAG tag の相補配列については下線で示した。Primer N と CR は FLf の増幅に、Primer A と Primer CR は Δ N346f (p120 の N 末端側 346 アミノ酸を欠失した分子) の増幅に用いた。その他の N 末欠失分子の構築には FLf 内の制限酵素断片を利用した。 Δ N101f には BglII/EcoRV による断片を、 Δ N157f には NcoI/EcoRV による断片を、 Δ N244f には SmaI/EcoRV による断片を、 Δ N323f には Bsu36I/EcoRV による断片を利用した。

p120 のカドヘリンとの相互作用に必要な領域、641 から 820 番目までのアミノ酸を削った変異分子 FL Δ Rf、 Δ N346 Δ Rf の作製には Primer CR と Primer Δ AR により増幅された DNA 断片を用いた。この増幅断片を PstI で切断し、FLf または Δ N346f を PstI で切断したものと結合させた(左図参照)。

このようにして得られた断片は pCA-pA 発現ベクター (Niwa et al., 1991)、pAdV-CA-pA アデノウイルス作製用シャトルベクター (Nakagawa and Takeichi, 1998)、pGEX1 λ T GST Fusion Protein 発現ベクター (#27-4805-01; Pharmacia Biotech) に挿入した。

pCMV-CBR(cN)-FLAG-PA の作製 (Dr. S. Nakagawaに拠る)

これはもともと細胞内領域だけを膜貫通領域をつけないで発現させる目的で作ったものです。後に cN-JM(-) を作るために人工的に加えた開始コドンの後に BglII サイトを入れてあります。

FW primer

5'-cgc cgtacg acc atg agatct aat gag gg acct aaa gca gcc-3'

(おまけ-SplII site-Kozak-人工メチオニン-BglII-Ncadherin cytoplasmic NEGLKAA)

RV primer

5'-gcggccgc ttactgtcatcgtcgtcctttagtc-3'

(これは見てのとおり NotI 付きフラッグアダプターのリバースプライマーです)

template には pCMV-cN/FLAG-pA (Nakagawa and Takeichi, 1998) を用いた。酵素には Pfu を使い、反応後 T4-kinase で平滑末端をリン酸化した後、SplII で切断して pCMV-pA の SplII-HpaI サイトにクローニングしました。こうして出来たベクターを pCMV-CBR(cN)-FLAG-PA と名付けました。

pCMV-cN/JM(-)-FLAG-pA の作製

あとはカドヘリンの細胞外を PCR で増やして前述のベクターに放り込むだけ。つなぎ目には BglII を使っているので余分に「RS」の配列が挿入されることになります。

FW-primer (これは pCMV-cN/FLAG-pA を作るのに使った FW-primer と同じ)

5'-cgc cgtacg acc atg tgc cgg ata gcg gga acg ccg-3'

(おまけ-SplII site-Kozak-Ncadherin extracellular MCRIATGP)

RV-primer (膜貫通の直後の配列 RRDKERQ に対してデザインしてあります)

5'-cgcg agatct ctg acg ctc ctt atc cgg cg-3'

増幅産物を SplII と BglII で切断して、同様に pCMV-CBR(cN)-FLAG-pA を切断したところに放り込んだものを pCMV-cN/JM(-)-FLAG-pA と名付けました。

アデノウイルスの作製

CAGプロモーターにより β -galactosidase を発現させることができる改変型アデノウイルスは森吉博士(京都大学医学部)に頂いた (Moriyoshi et al., 1996)。アデノウイルスの作製は森吉らの方法(Moriyoshi et al., 1996)にしたがった。DH10で培養したHEK293細胞に0.2 μ gのウイルスゲノムDNA断片と直鎖状にしたアデノウイルス作製用シャトルベクターを LIPOFECT AMINE™(#18324-012; Life Tech)を用いて形質導入した。この細胞を翌日コラーゲンコート済みの24穴プレート(Iwaki Co.)に移した。約10日後産生されたウイルスにより死滅した細胞で満たされた穴から、細胞のペレットを回収しX-gal染色、免疫組織化学、ウエスタンブロット法により目的のウイルスができているかを調べた。この方法でCAGプロモーターでタンパク質を発現させるアデノウイルス、AdV-CA-FLf、

AdV-CA-ΔN101f、AdV-CA-ΔN157f、AdV-CA-ΔN244f、AdV-CA-ΔN346fを得た。改変型アデノウイルスは293細胞を用いて増やしCsCl₂のステップグラディエント超遠心により精製した(Kanegae et al., 1994)。精製されたアデノウイルスはFCSを最終10%になるように加え実験に使用するまでは-80℃で保管した。

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動

タンパク質の分離は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (Laemmli, 1970) を用いた。サンプルは専用のSDSサンプルバッファーに懸濁後、β-mercaptoethanolを5%量加え、10分間煮沸し調製した。泳動したタンパク質は電気的にニトロセルロース膜に転写し、5% skimmed milk (Difco) / TBS-Caでブロッキング後、適度に希釈した一次抗体と反応させた。二次抗体には、Horse Radish Peroxydase 結合型の抗IgG抗体 (別項参照) を使用した。シグナルはEnhanced Chemiluminescence System (RPN2106; Amersham) を用いて検出した。抗体の洗いは0.05% tween-20を含むTBS-Caで各30分間(10分間×3)行った。

TC処理, TE処理

TC処理による形態の変化を観察する際は、細胞は血清を含まないDH10 (DH) で2回洗った後、DHと結晶トリプシン (T-8253; Sigma) 存在下で培養した。TC処理に続いてタンパク質の解析を行う際は、細胞を培養皿からピペッティングにより回収しDHで2回洗った後、DH 5 mlと0.001% 結晶トリプシンに懸濁して37℃で振とうさせながら反応させた。最後に0.005% 大豆トリプシンインヒビター (T-6522; Sigma) / HBSSで2回洗い反応を止め、次の実験に用いた。TE処理はDHのかわりに1 mM EDTA / HCMFを用いた以外はTC処理と同じ手順で行った。

免疫組織化学

抗体染色に用いる細胞はコラーゲンコートしたカバーガラス上であらかじめ培養しておいた。この細胞をHBSSで洗った後、4% paraformaldehyde入りHBSSを加え、4℃で静置し固定した。次に、このサンプルをHBSSで洗い、細胞膜の浸透性を高めるために100% methanolを加え-20℃に置いた。次に、TBS-Caで洗浄後、5% skimmed milk / TBS-Caを加え室温で静置しブロッキングしたのち、一次抗体と反応させた。TBS-Caで洗浄後引き続き二次抗体と反応させたサンプルは、TBS-Caで洗浄し三次抗体と反応させた後TBS-Caで洗浄し、さらに蒸留水ですすいだのち包埋した。包埋剤には90% glycerolに0.01% PPDAを加えたものを用いた。

細胞の可溶化、免疫沈降法

実験に用いる細胞は1 mM PMSF / HBSSで洗った後回収し、溶解バッファー (TBS-Triton; 1 % Triton X-100, 1 % NP-40, 1 mM PMSF, 1 mM sodium vanadate, 50 mM NaF in TBS-Ca pH 7.6) に懸濁し氷上で30分間振とうして可溶化させた。このサンプルを遠心分離して得た上清をS画分、ペレットをI画分とした。免疫沈降はS画分中のタンパク質を対象に行った。S画分は引き続いて二次抗体のついたビーズと0.5 % BSA存在下で20分インキュベートし二次抗体と非特異的に結合するタンパク質を除いた後、一次抗体、二次抗体と順に各1時間反応させた。最後に溶解バッファーで洗浄(0分 x 1と15分 x 3)した後SDSサンプルバッファー(試薬の項参照)と β -mercaptoethanolを5 %量加え10分間煮沸した。煮沸後はすみやかに氷で冷却し遠心分離機でビーズを沈降させ、上清を回収しSDS-PAGE法で分析した。

ホスホアミノ酸分析

^{32}P を含む専用の培養液で16時間培養しラベルした細胞から前出の方法でp120を選択的に回収しオートラジオグラフィーで検出した。次にこのシグナルに対応するバンドをゲルから切りだし500 μl の50 mM NH_4HCO_3 , 5 % β -mercaptoethanol, 0.01 % SDSにタンパク質を抽出した。このタンパク質を6 N HClで加水分解後薄層クロマトグラフィーで二次元展開しオートラジオグラフィーで検出した。データの出力、解析にはバイオイメージングアナライザーBAS2000 (FUJIX)を用いた。

フォスファテース処理

フォスファテース処理は免疫沈降されて二次抗体ビーズに結合した状態のタンパク質について行った。免疫沈降の最後の洗いの後で、さらにフォスファテース反応バッファー(50 mM Tris-Cl pH 8.5, 50 mM MgCl_2 , 1 mM PMSF, 10 mM DTT, 0.1 % Triton X-100, 1 % NP-40)で洗いフォスファテース阻害剤を除き、反応バッファー27 μl 、calf intestine phosphatase (#567-744; Boeringer) 3 μl を加えて30°Cで1時間振とうながら反応させた。反応の終了はEDTA添加(final 17 mM)で行い、ただちにSDSサンプルバッファーと β -mercaptoethanolを5 %量加え10分間煮沸した。煮沸後の扱いは免疫沈降の際と同じである。

in Vitro タンパク質結合実験

グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)と α -カテニン、 β -カテニン、E-カドヘリンの細胞質領域との融合タンパク質をコードしている発現ベクター、GST- α -catenin、GST- β -catenin、GST-E-E-cad-cytoは京都大学医学部の伊藤雅彦博士から頂いた(Itoh et al., 1997)。融合タンパク質は大腸菌DH5 α 株に合成させた。300 mlの培養液で培養した菌を回収し1 mM EDTA と1mM PMSF を含む15 ml のTBS (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl) に懸濁しソニケーターを用いて菌体を破碎した。次に、破碎したものを27000gで10分、100,000gで10分遠心分離しその上精を回収した。この上精を100 μ lのglutathione-Sepharose 4Bビーズ(Pharmacia Bioech)と氷上で1時間反応させた後、TBS-Tritonで5分ずつ3回洗った。p120 とGST融合タンパク質との相互作用を調べる際には、先に述べたColo 205細胞の抽出液1 mlとこのビーズ 100 μ lとを氷上で1時間反応させ、TBS-Tritonで10分ずつ4回洗った。洗浄後のビーズは最後に100 μ lのSDSサンプルバッファーを加え、5分間煮沸した。

アドレス

Amersham Int.	Amersham, UK
Biomol Research Lab. Inc.	Plymouth Meeting, PA
Boehringer Mannheim GmbH.	Mannheim, Germany
Carl Zeiss Inc.	Thornwood, NY
Cedarlane Lab. Ltd.	Horbbby, Ontario, CA
Chemicon Int. Inc.	Temecula, CA
Difco Laboratories	Detroit, MI
FUJIX Inc.	Tokyo, Japan
Iwaki Co.	Tokyo, Japan
Kyowa Medex Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Life Science Products Inc.	Boston, MA
Life Tech. Inc.	Gaithersburg, MD
Marysol	Tokyo, Japan
Nunc Inc.	Naperville, IL
Pharmacia Biotech	Uppsala, Sweden
Research Biochemicals Inc.	Natick, MA
Santa Cruz Biotech. Inc.	Santa Cruz, CA
Sigma Chemical Co.	St. Louis, MO
Transduction Lab.	Lexington, KY
Upstate Biotech.	Lake Placid, NY
Zymed Lab., Inc.	San Francisco, CA

第六章

参考文献、他

- Aghib, D.F., and P.D. McCrea. 1995. The E-cadherin complex contains the src substrate p120. *Exp. Cell Res.* 218:359-69.
- Balsamo, J., C. Arregui, T. Leung, and J. Lilien. 1998. The nonreceptor protein tyrosine phosphatase PTP1B binds to the cytoplasmic domain of N-cadherin and regulates the cadherin-actin linkage. *J. Cell Biol.* 143:523-532.
- Barth, A.L.M., I.S. Nathke, and W.J. Nelson. 1997. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:683-690.
- Bauer, A., H. Lickert, R. Kemler, and J. Stappert. 1998. Modification of the E-cadherin-catenin complex in mitotic Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 273:28314-28321.
- Brady-Kalnay, S., D.L. Rimm, and N.K. Tonks. 1995. Receptor protein tyrosine phosphatase PTP μ associates with cadherin and catenins in vivo. *J. Cell Biol.* 130:977-986.
- Bullions, L.C., D.A. Notterman, L.S. Chung, and A.J. Levine. 1997. Expression of wild-type α -catenin protein in cells with a mutant α -catenin gene restores both growth regulation and tumor suppressor activities. *Mol. Cell. Biol.* 17:4501-4508.
- Calautti, E., S. Cabodi, P.L. Stein, M. Hatzfeld, N. Kedersha, and G. Paolo Dotto. 1998. Tyrosine phosphorylation and src family kinases control keratinocyte cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* 141:1449-1465.
- Chen, H., N.E. Paradies, M. Fedor-Chaiken, and R. Brackenbury. 1997. E-cadherin mediates adhesion and suppresses cell motility via distinct mechanisms. *J. Cell Sci.* 110:345-356.
- Chitaev, N.A., and S.M. Troyanovsky. 1998. Adhesive but not lateral E-cadherin complexes require calcium and catenins for their formation. *J. Cell Biol.* 142:837-846.
- Daniel, J. M., and A.B. Reynolds. 1995. The tyrosine kinase substrate p120^{cas} binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous polyposis coli protein or α -catenin. *Mol. Cell. Biol.* 15:4819-4824.
- Daniel, J.M. 1997. Tyrosin phosphorylation and cadherin/catenin function. *Bioessays.* 19:883-891.
- Downing J.R., and A.B. Reynolds. 1991. PDGF, CSF-1, and EGF induce tyrosine phosphorylation of p120, a pp60^{src} transformation-associated substrate. *Oncogene.* 6:607-13.
- Feason, E.R., and B. Vogelstein. 1990. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis (Review). *Cell.* 61:759-767
- Finnemann, S., I. Mitrik, M. Hess, G. Otto, and D. Wedlich. 1997. Uncoupling of XB/U-cadherin-catenin complex formation from its function in cell-cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 272:11856-11862.
- Fleming, T.P., and M.H. Johnson. 1988. From egg to epithelium. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:459-485.
- Fogh, J., and G. Trempe. 1975. New human tumor lines. In *Human Tumor Cells in vitro*. J. Fogh, editor. Plenum Press, New York, NY. 115-141.

- Frixen, U. H., J. Behrens, M. Sachs, G. Eberle, B. Voss, A. Warda, D. Lochner, and W. Birchmeier. 1991. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J. Cell. Biol.* 113:173-185.
- Gaush, C.R., W.L. Hard, and T.F. Smith. 1966. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 122:931-935.
- Geis, K., H. Aberle, M. Kuhl, R. Kemler, and D. Wedlich. 1998. Expression of the Armadillo family member p120^{cas} in *Xenopus* embryos affects head differentiation but not axis formation. *Dev. Genes Evol.* 207:471-481.
- Gumbiner, B.M. 1996. Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell.* 84:345-357.
- Hamaguchi, M., N. Matsuyoshi, Y. Ohnishi, B. Gotoh, M. Takeichi, and Y. Nagai. 1993. p60^{src} causes tyrosine phosphorylation and inactivation of the N-cadherin-catenin cell adhesion system. *EMBO J.* 12:307-314.
- Hatta, K., A. Nose, A. Nagafuchi, and M. Takeichi. 1988. Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecule: its identity in the cadherin gene family. *J. Cell Biol.* 106:873-81.
- Hatzfeld, M. 1999. The Armadillo family of structural proteins. In *International Review of Cytology*. Vol. 186. Academic Press, Orlando, FL. 179-224.
- Hatzfeld, M. 1997. Band 6 protein and cytoskeletal organization. In "Cytoskeletal-Membrane Interactions and Signal Transduction" (P. Cowin and M.W. Klymkowsky eds.), pp. 49-57. Landes Bioscience, Austin, TX.
- Hatzfeld, M., and C. Nachtsheim. 1996. Cloning and characterization of a new armadillo family member, p0071, associated with the junctional plaque: evidence for a subfamily of closely related proteins. *J. Cell Sci.* 109:2767-2778.
- Hatzfeld, M., G.I. Kristjansson, U. Plessmann, and K. Weber. 1994. Band 6 protein, a major constituent of desmosomes from stratified epithelia, is a novel member of the armadillo multigene family. *J. Cell Sci.* 107:2259-70.
- Hazan, R.B., and L. Norton. 1998. The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 273:9078-9084.
- Heid, H.W., A. Schmidt, R. Zimbelmann, S. Schafer, S. Winter-Simanowski, S. Stumpp, M. Keith, U. Figge, M. Schnolzer, and W.W. Franke. 1994. Cell type-specific desmosomal plaque proteins of the plakoglobin family: plakophilin 1 (band 6 protein). *Differentiation*. 58:113-131.
- Hirano, S., N. Kimoto, Y. Shimoyama, S. Hirohashi, and M. Takeichi. 1992. Identification of a neural alpha-catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell*. 70:293-301.
- Hirano, S., A. Nose, K. Hatta, A. Kawakami, and M. Takeichi. 1987. Calcium-dependent Cell-Cell Adhesion Molecules (Cadherins): Subclass Specificities and Possible Involvement of Actin Bundles. *J. Cell Biol.* 105:2501-2510.

- Hoschuetzky, H., H. Aberle, and R. Kemler. 1994. β -catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol.* 127:1375-80.
- Itoh, M., A. Nagafuchi, S. Moroi, and S. Tsukita. 1997. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to α catenin and actin filaments. *J. Cell Biol.* 138:181-192.
- Johnson, K.R., J.E. Lewis, D. Li, J. Wahl, A.P. Soler, K.A. Knudsen, and M.J. Wheelock. 1993. P- and E-cadherin are in separate complexes in cells expressing both cadherins. *Exp. Cell Res.* 207:252-260.
- Jou, T.S., D.B. Stewart, J. Stappert, W.J. Nelson, and J.A. Marrs. 1995. Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92:5067-5071.
- Kanegae, Y., M. Makimura, and I. Saito. 1994. A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 47:157-166.
- Kemperman, H., Y. Wijnands, J. Wesseling, C.M. Niessen, A. Sonnenberg, and E. Roos. 1994. The mucin epiglycanin on TA3/Ha carcinoma cells prevents $\alpha 6 \beta 4$ - mediated adhesion to laminin and kalinin and E-cadherin-mediated cell-cell interaction. *J. Cell Biol.* 127:2071-2080.
- Kinch, M.S., G.J. Clark, C.J. Der, and K. Burridge. 1995. Tyrosine phosphorylation regulates the adhesions of ras-transformed breast epithelia. *J. Cell Biol.* 130:461-471.
- Knudsen, K.A., A.P. Soler, K.R. Johnson, and M.J. Wheelock. 1995. Interaction of α -actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via α -catenin. *J. Cell Biol.* 130:67-77.
- Kondo, K., N. Kohno, A. Yokoyama, and K. Hiwada. 1998. Decreased MUC1 expression induces E-cadherin-mediated cell adhesion of breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 58:2014-2019.
- Kuroda, S., M. Fukata, M. Nakagawa, K. Fujii, T. Nakamura, T. Ookubo, I. Izawa, T. Nagase, N. Nomura, H. Tani, I. Shoji, Y. Matsuura, S. Yonehara, and K. Kaibuchi. 1998. Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Science.* 281:832-5.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lampugnani, M.G., M. Corada, P. Andriopoulou, S. Esser, W. Risau, and E. Dejana. 1997. Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells. *J. Cell Sci.* 110:2065-2077.
- Liu, D., I. el-Hariry, A.J. Karayiannis, J. Wilding, R. Chinry, W. Kmiot, P.D. McCrea, W.J. Gullick, and M. Pignatelli. 1997. Phosphorylation of β -catenin and epidermal growth factor receptor by intestinal trefoil factor. *Lab. Invest.* 77:557-563.
- Lu, Q., M. Paredes, M. Medina, J. Zhou, R. Cavallo, M. Peifer, L. Orecchio, and K.S. Kosik. 1999. δ -Catenin, an adhesive junction-associated protein which promotes cell scattering. *J. Cell Biol.* 144:519-532.

- Matsuyoshi, N., M. Hamaguchi, S. Taniguchi, A. Nagafuchi, S. Tsukita, and M. Takeichi. 1992. Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *J. Cell Biol.* 118:703-714.
- McCrea, P.D., C.W. Turck, and B. Gumbiner. 1991. A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science*. 254:1359-1361.
- Mertens, C., C. Kuhn, and W.W. Franke. 1996. Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *J. Cell Biol.* 135:1009-1025.
- Mo, Y.Y., and A.B. Reynolds. 1996. Identification of murine p120 isoforms and heterogeneous expression of p120^{cas} isoforms in human tumor cell lines. *Cancer Res.* 56:2633-2640.
- Moriyoshi, K., L.J. Richards, C. Akazawa, D.D. O'Leary, and S. Nakanishi. 1996. Labeling neural cells using adenoviral gene transfer of membrane-targeted GFP. *Neuron*. 16:255-260.
- Nagafuchi, A., and M. Takeichi. 1988. Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *EMBO J.* 7:3679-3684.
- Nagafuchi, A., and M. Takeichi. 1989. Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of cadherin. *Cell Regul.* 1:37-44.
- Nagafuchi, A., M. Takeichi, and S. Tsukita. 1991. The 102 kD cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell*. 65:849-857.
- Nagafuchi, A., S. Ishihara, and S. Tsukita. 1994. The roles of catenins in the cadherin-mediated cell adhesion: functional analysis of E-cadherin- α catenin fusion molecules. *J. Cell Biol.* 127. 235-245
- Nakagawa, S., and M. Takeichi. 1998. Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression. *Development*. 125:2963-2971.
- Niwa, H., K. Yamamura, and J. Miyazaki. 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*. 108:193-200.
- Oyama, T., Y. Kanai, A. Ochiai, S. Akimoto, T. Oda, K. Yanagihara, A. Nagafuchi, S. Tsukita, S. Shibamoto, F. Ito, and et al. 1994. A truncated β -catenin disrupts the interaction between E-cadherin and α -catenin: a cause of loss of intercellular adhesiveness in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 54:6282-6287.
- Ozawa, M., and R. Kemler. 1998a. Altered cell adhesion activity by pervanadate due to the dissociation of α -catenin from the E-cadherin-catenin complex. *J. Biol. Chem.* 273:6166-6170.
- Ozawa, M., and R. Kemler. 1998b. The membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain prevents dimerization and negatively regulates adhesion activity. *J. Cell Biol.* 142:1605-1613.
- Paffenholz, R., and W.W. Franke. 1997. Identification and localization of a neurally expressed member of the plakoglobin/armadillo multigene family. *Differentiation*. 61:293-304.

- Park, J., A. I. Meisler, and C. A. Cartwright. 1993. c-Yes tyrosine kinase activity in human colon carcinoma. *Oncogene*. 8:2627-2635
- Peifer, M., S. Berg, and A.B. Reynolds. 1994. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles [letter]. *Cell*. 76:789-791.
- Ratcliffe, M.J., L.L. Rubin, and J.M. Staddon. 1997. Dephosphorylation of the cadherin-associated p100/p120 proteins in response to activation of protein kinase C in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 272:31894-31901.
- Reynolds, A.B., D.J. Roesel, S.B. Kanner, and J.T. Parsons. 1989. Transformation specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. *Mol Cell Biol.* 9:629-38.
- Reynolds, A.B., L. Herbert, J.L. Cleveland, S.T. Berg, and J.R. Gaut. 1992. p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60^{src}, is related to cadherin-binding factors β -catenin, plakoglobin and armadillo. *Oncogene*. 7:2439-2445.
- Reynolds, A.B., J. Daniel, P.D. McCrea, M.J. Wheelock, J. Wu, and Z. Zhang. 1994. Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120^{cas} associates with E-cadherin complexes. *Mol. Cell. Biol.* 14:8333-8342.
- Riehl, R., K. Johnson, R. Bradley, G.B. Grunwald, E. Cornet, A. Lillienbaum, and C.E. Holt. 1996. Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. *Neuron*. 17:837-848.
- Riggleman, B., E. Wieschaus, and P. Schedl. 1989. Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a Drosophila segment polarity gene. *Genes Dev.* 3:96-113.
- Rimm, D.L., E.R. Koslov, P. Kebriaei, C.D. Ciani, and J.S. Morrow. 1995. Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92:8813-8817.
- Roe, S., E.R. Koslov, and D.L. Rimm. 1998. A mutation in alpha-catenin disrupts adhesion in clone A cells without perturbing its actin and β -catenin binding activity. *Cell Adhes. Commun.* 5:283-296.
- Rosato, R., J.M. Veltmaat, J. Groffen, and N. Heisterkamp. 1998. Involvement of the tyrosine kinase fer in cell adhesion. *Mol. Cell. Biol.* 18:5762-5770.
- Rubinfeld, B., P. Robbins, M. El-Gamil, I. Albert, E. Porfili, and P. Polakis. 1997. Stabilization of β -catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science*. 275:1790-1792.
- Rubinfeld, B., B. Souza, I. Albert, O. Muller, S. H. Chamberlain, F. R. Masiarz, S. Munemitsu, and P. Polakis. 1993. Association of the APC gene product with β -catenin. *Science*. 262:1731-1734
- Ryuto, M., S. Jimi, M. Ono, S. Naito, Y. Nakayama, Y. Yamada, S. Komiyama, and M. Kuwano. 1997. All-trans-retinoic acid-dependent inhibition of E-cadherin-based cell adhesion with concomitant dephosphorylation of β -catenin in metastatic human renal carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 88:982-991.

- Schlessinger, J., and A. Ullrich. 1992. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron*. 9:383-91.
- Semple, T.U., L.A. Quinn, L.K. Woods, and G.E. Moore. 1978. Tumor and lymphoid cell lines from a patient with carcinoma of the colon for a cytotoxicity model. *Cancer Res.* 38:1345-1355.
- Serres, M., C. Grangeasse, M. Haftek, Y. Durocher, B. Duclos, and D. Schmitt. 1997. Hyperphosphorylation of β -catenin on serine-threonine residues and loss of cell-cell contacts induced by calyculin A and okadaic acid in human epidermal cells. *Exp. Cell Res.* 231:163-172.
- Shibamoto, S., M. Hayakawa, K. Takeuchi, T. Hori, N. Oku, K. Miyazawa, N. Kitamura, M. Takeichi, and F. Ito. 1994. Tyrosine phosphorylation of β -catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. *Cell Adhes. Commun.* 1:295-305.
- Shibamoto, S., M. Hayakawa, K. Takeuchi, T. Hori, K. Miyazawa, N. Kitamura, K.R. Johnson, M.J. Wheelock, N. Matsuyoshi, M. Takeichi, and et al. 1995. Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. *J. Cell Biol.* 128:949-957.
- Shibata, T., A. Ochiai, Y. Kanai, S. Akimoto, M. Gotoh, N. Yasui, R. Machinami, and S. Hirohashi. 1996. Dominant negative inhibition of the association between β -catenin and c-erbB2 by N-terminally deleted beta-catenin suppresses the invasion and metastasis of cancer cells. *Oncogene*. 13:883-889.
- Shimoyama, Y., S. Hirohashi, S. Hirano, M. Noguchi, Y. Shimosato, M. Takeichi, and O. Abe. 1989. Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res.* 49:2128-2133.
- Shimoyama, Y., A. Nagafuchi, S. Fujita, M. Gotoh, M. Takeichi, S. Tsukita, and S. Hirohashi. 1992. Cadherin dysfunction in a human cancer cell line: possible involvement of loss of alpha-catenin expression in reduced cell-cell adhesiveness. *Cancer Res.* 52:5770-5774.
- Shiozaki, H., H. Oka, M. Inoue, S. Tamura, and M. Monden. 1996. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer*. 77:1605-1613.
- Sirotkin, H., H. O'Donnell, R. DasGupta, S. Halford, B. St. Jore, A. Puech, S. Parimoo, B. Morrow, A. Skoultschi, S.M. Weissman, P. Scambler, and R. Kucherlapati. 1997. Identification of a new human catenin gene family member (ARVCF) from the region deleted in velo-cardio-facial syndrome. *Genomics*. 41:75-83.
- Skoudy A., M.D. Llosas, and A.G. de Herreros. 1996. Intestinal HT-29 cells with dysfunction of E-cadherin show increased pp60^{src} activity and tyrosine phosphorylation of p120-catenin. *Biochem J.* 317:279-84.
- Staddon, J.M., C. Smales, C. Schulze, F.S. Esch, and L.L. Rubin. 1995. p120, a p120-related protein (p100), and the cadherin/catenin complex. *J. Cell Biol.* 130:369-381.
- Su, L-K., B. Vogelstein, and K. W. Kinzler. 1993. Association of the APC Tumor Suppressor Protein with Catenins. *Science*. 262:1734-1737
- Takahashi, J., E. Kobayashi, H. Nakano, C. Murakata, H. Saitoh, K. Suzuki, and T. Tamaoki. 1990. Potent selective inhibition of 7-O-methyl UCN-01 against protein kinase C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255:1218-1221.

- Takahashi, K., K. Suzuki, and Y. Tsukatani. 1997. Induction of tyrosine phosphorylation and association of beta-catenin with EGF receptor upon tryptic digestion of quiescent cells at confluence. *Oncogene*. 15:71-78.
- Takaishi, K., T. Sasaki, M. Kato, W. Yamochi, S. Kuroda, T. Nakamura, M. Takeichi, and Y. Takai. 1994. Involvement of Rho p21 small GTP-binding protein and its regulator in the HGF-induced cell motility. *Oncogene*. 9:273-279.
- Takaishi, K., T. Sasaki, H. Kotani, H. Nishioka, and Y. Takai. 1997. Regulation of cell-cell adhesion by Rac and Rho small G proteins in MDCK cells. *J. Cell Biol.* 139:1047-1059.
- Takeda, H., A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita, J. Behrens, W. Birchmeier, and S. Tsukita. 1995. V-src kinase shifts the cadherin-based cell adhesion from the strong to the weak state and beta catenin is not required for the shift. *J. Cell Biol.* 131:1839-47
- Takeichi, M. 1977. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J. Cell Biol.* 75:464-474.
- Takeichi, M. 1988. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*. 102:639-655.
- Takeichi, M. 1991. Cadherins cell adhesion receptors as a morphogenic regulator (review). *Science*. 251:1451-1455.
- Takeichi, M. 1993. Cadherin in cancer: implications for invasion and metastasis (review). *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:806-811.
- Takeichi, M. 1995. Morphogenetic roles of classic cadherin (review). *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:619-627.
- Torres, M., A. Stoykova, O. Huber, K. Chowdhury, P. Bonaldo, A. Mansouri, S. Butz, R. Kemler, and P. Gruss. 1997. An α E-catenin gene trap mutation defines its function in preimplantation development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 94:901-906.
- Towens, P. L., and J. Holtreter. 1955. Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *J. Exp. Zool.* 128:53-120
- Tsukita, S., K. Oishi, T. Akiyama, Y. Yamanashi, T. Yamamoto, and S. Tsukita. 1991. Specific proto-oncogene tyrosine kinase of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. *J. Cell Biol.* 113:867-879.
- Tsukita, S., S. Tsukita, A. Nagafuchi, and S. Yonemura. 1992. Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:834-839.
- Vleminckx, K.L., L.V. Jr, M.M. Mareel, W. Fires, and F.M. van Roy. 1991. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor reveals an invasion suppressor role. *Cell*. 66:107-119.
- Vleminckx, K.L., J.J. Deman, E.A. Bruyneel, G.M.R. Vandenbossche, A.A. Keirsebilck, M.M. Mareel, and F.M. van Roy. 1994. Enlarged cell-associated proteoglycans abolish E-cadherin functionality in invasive tumor cells. *Cancer Res.* 54:873-877.

- Watabe, M., A. Nagafuchi, S. Tsukita, and M. Takeichi. 1994. Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line. *J. Cell Biol.* 127:247-256.
- Watabe-Uchida, M., N. Uchida, Y. Imamura, A. Nagafuchi, K. Fujimoto, T. Uemura, S. Vermeulen, F. van Roy, E.D. Adamson, and M. Takeichi. 1998. α -Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J. Cell Biol.* 142:847-857.
- Wesseling, J., S.W. van der Valk, and J. Hilken. 1996. A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1. *Mol. Biol. Cell.* 7:565-577.
- Yamamoto, M., V.P. Bhavanandan, S. Nakamori, and T. Irimura. 1996. A novel monoclonal antibody specific for sialylated MUC1 mucin. *Jpn. J. Cancer Res.* 87:488-496.
- Yap, A.S., C.M. Niessen, and B.M. Gumbiner. 1998. The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120^{cas}. *J. Cell Biol.* 141:779-789.
- Zhou, J., U. Liyanage, M. Medina, C. Ho, A.D. Simmons, M. Lovett, and K.S. Kosik. 1997. Presenilin 1 interaction in the brain with a novel member of the Armadillo family. *Neuroreport.* 8:2085-90.

謝辞

研究を始めてから五年半になりますが、この間興味深い研究テーマを与えてくださるだけでなく、マイペースの私を時には叱咤し、たまには励まし今日まで導いてくださった竹市雅俊教授に、心から感謝致します。また、千坂修先生、上村匡先生には常日ごろのディスカッションから多くのものを学ばせていただきました。Toledo大学のWheelock博士、京都大学医学研究科月田研究室の伊藤雅彦博士、永渕昭良博士、同中西研究室の森吉弘毅博士、摂南大の芝本さゆみ博士には、貴重な抗体や発現ベクター、ウイルスを分けていただきました。協和発酵の玉沖達也博士には各種カイネース阻害剤を分与していただきました。京都大学理学研究科の西田栄介教授、後藤由季子博士(当時)、森口徹生博士には、ホスホアミノ酸分析の件で大変お世話になりました。相宗睦子さん、今井敬子さん、寺西登史子さんにもいろいろお世話になりました。そして最後に研究する雰囲気を作り上げてくれた竹市研のみなさんに御礼申し上げます。

青野真也

平成11年4月8日